植物诱导抗病性

原理和研究

董汉松 主编

科学出版社

植物诱导抗病性

原理和研究

董汉松　主编

科学出版社

1995

INDUCED RESISTANCE AGAINST DISEASES IN PLANTS

Principle and Practice

Dong Hansong
(Chief editor in general)

Science Press
1 9 9 5

（京）新登字 092 号

内 容 简 介

本书分四部分。第一部分是“植物诱导抗病性的理论体系”，分 3 个层次，以植物-微生物共同进化、植物-病原物相互作用、基因对基因关系为线索，从基因控制、遗传运作、信号传导、抗病防卫功能因子的诱发和作用、抗病防卫的“链-环反应”及在不同生物类群背景上的生物学和病理学功能等方面，系统构架了植物诱导抗病性的理论体系。第二部分论述了利用诱导抗性控制作物病害的策略和途径。第三部分是对烟草赤星病的研究报告，以寄主-病菌分子和群体互作为主线，为烟草抗赤星病诱导的研究提供病理基础。第四部分“烟草诱导抗病性”分诱导抗性的生物学、发生机制、利用途径、多抗作用等 4 个层次。

本书适于生物、农、医学科研人员、教师、研究生和高年级大学生阅读。

植物诱导抗病性

原理和研究

董汉松 主编

责任编辑 王惠君 范淑琴

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

北京市华中印刷厂 印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1995 年 5 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

1995 年 5 月第一次印刷 印张：30 1/4 插页：2

印数：—1 200 字数：689 000

ISBN 7-03-004652-8/Q・576

定价：49.00 元

谨以此书

敬祝我的导师方中达教授八十岁生日

——董汉松

生物之抗性无疑决定于基因但基因之表达亦可受外因之影响所谓诱导抗性乃由此原理而实现迄今为止已知可用以作诱导之因子理化及生物三类于诱抗对像则涉及一切病原生物今董汉松教授集国内之有关资料于一书诚有利于此学科之发展特为序



裘维蕃时年八十有三

近年来对一些抗病基因在分子水平上的分析发现抗真菌细菌和病毒的基因具有显著的序列同源性，为基因分离和结构与功能研究开辟了新途径。而植物诱导抗病性的研究从另一个侧面探讨抗病性的激发信号传导和保卫反病毒的机制。两个方面的突破无疑将推动抗病性理论和实践的发展。田波 94.12.14

编 著 人 员

主　编　董汉松

副主编　刘爱新　徐文联　刘伯新

编　委(以姓氏笔画为序)

卢绪京　刘广玉　刘延荣　朱广振　许权阁
孙学勤　张成喜　张学君　张留义　李振喜
李怀方　林永柱　范洪慈　郑继法　桑传杰
高明友　蒋五玲

EDITORIAL COMMITTEE

Chief editor in general Dong Hansong

Vice chief editors in general Liu Aixin, Xu Wenlian and Liu Boxin

Invited editorial members

Fan Hongci, Gao Mingyou, Jiang Wuling, Li Huaifang, Li Zhenxi, Lin Yongzhu, Liu Guangyu, Liu Yanrong, Lu Xujing, Sang Chuanjie, Sun Xueqin, Xu Quange, Zhang Chengxi,Zhang liuyi, Zhang Xuejun, Zheng Jifa and Zhu Guangzhen

作者及工作单位

（以姓氏笔画为序）

卜晓东　山东省烟草公司，济南　251000
于建立　山东省潍坊供销学校，潍坊　261000
王金生　南京农业大学，南京　210095
王彦亭　中国烟草总公司，北京　100053
王　惠　山东省林业学校，泰安　271018
王少华　山东农业大学，泰安　271018
王少杰　山东省生物研究所，济南　250014
王智发　山东农业大学，泰安　271018
王兴利　山东省烟草公司，济南　251000
王仍成　山东省沂水县烟草公司，山东沂水　276400
牛柱峰　山东省莒县烟草公司，山东莒县　276500
厉启东　山东省莒南县烟草公司，山东莒南县　276000
尹东升　山东省昌乐县烟草公司，山东昌乐　261000
田福海　山东省沂水县烟草公司，山东沂水　276400
卢培秀　中国烟叶进出口公司山东分公司，青岛　266000
许权阁　安徽省亳州市烟草分公司　安徽亳州　236810
吕士恩　山东农业大学，泰安　271018
孙衍坤　山东省三联集团生物产业总公司，济南　250033
孙立松　山东省烟草公司，济南　251000
孙明业　山东省莒县烟草公司，山东莒县　276500
孙晓平　中国农业科学研究院，北京　100081
孙运达　山东省临沂地区农业局，临沂　276001
孙学勤　安徽省亳州市烟草公司，安徽亳州　236810
刘伯新　山东省临沂市烟草分公司，临沂　276003
刘广玉　山东省临沂地区烟草研究所，临沂　276003
刘长征　山东农业大学，泰安　271018
刘爱新　山东农业大学，泰安　271018
刘延荣　山东农业大学，泰安　271018
刘广亮　山东省沂水县烟草公司，山东沂水　276400
刘成新　山东省沂南县烟草公司，山东沂南　276300
曲建军　山东省蓬莱县园林管理所，山东蓬莱 265600
肖庆义　山东省莒县烟草公司，山东莒县　276500
李怀方　北京农业大学，北京　100094
李世东　北京农业大学，北京　100094

李振喜　山东省莒南县烟草公司，山东莒南　276600
张学君　南京农业大学，南京　210095
张成喜　胜利油田农业科技公司，东营　257237
张广民　山东农业大学，泰安　271018
张宪省　山东农业大学，泰安　271018
张修国　山东农业大学，泰安　271018
张春玲　山东农业大学，泰安　271018
张留义　山东省郓城县农业局，山东郓城　274000
张明圣　山东省临朐县烟草公司，山东临朐　262600
初明光　山东省成武县农业局，山东成武　253000
陈瑞泰　山东农业大学，泰安　271018
陈建文　山东农业大学，泰安　271018
杨合同　山东省生物研究所，济南　250014
杨举田　山东省沂南县烟草公司，山东沂南　276300
杨献营　山东省烟草公司，济南　251000
范洪慈　山东省临沂地区烟草研究所，临沂　276003
周　昕　山东省临朐县烟草公司，山东临朐　262600
宗树林　山东省潍坊市烟草分公司，潍坊　261000
宗显华　山东省临朐县烟草公司，山东临朐　262600
林永柱　山东省沂南县烟草公司，山东沂南　276300
郑继法　山东农业大学，泰安　271018
赵　兵　山东省沂水县烟草公司，山东沂水　276400
姜广正　山东农业大学，泰安　271018
侯跃亮　山东省临朐县烟草公司，山东临朐　262600
侯成晓　山东农业大学，泰安　271018
姚　革　四川省农业科学研究院，成都　610066
徐文联　清华大学，北京　100084
秦引萍　北京农业大学，北京　100094
高明友　山东省枣庄市农业局，山东枣庄　277300
高正良　安徽省农业科学研究院烟草研究所，安徽凤阳　233100
钱玉梅　安徽农科院烟草所，安徽凤阳　233100
桑传杰　安徽省亳州市烟草分公司，安徽亳州　236810
梁元存　山东农业大学，泰安　271018
曹常余　山东省淄博市临淄区农业局，淄博临淄　255000
蒋五玲　清华大学，北京　100084
彭友良　北京农业大学，北京　100094
董汉松　山东农业大学，泰安　271018
潘　军　山东农业大学，泰安　271018

Contributors and Researchers

Bu Xiaodong, *Assoc. Prof. of Plant Protection*
Tobacco Company of Shandong Province, Jinan 251000

Cao Changyu, *Agronomist of Plant Protection*
Agricultural Bureau of Linzi, Zibo, Shandong 255000

Chen Jianwen, *Assoc. Agronomist of Plant Pathology*
The Pepole's Government of Qingzhou City, Qingzhou, Shandong, 226700

Chen Ruitai, *Prof. of Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Chu Mingguang, *Agronomist of Plant Protection*
Agricultural Bureau of Chengwu, Shandong 253000

Dong Hansong, *Ph. D/Prof. of Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Fan Hongci, *Assoc. Prof. of Tobacco Production*
Tobacco Company of Shandong Province, Linyi Branch, Linyi, Shandong 276003

Gao Mingyou, *Assoc. Prof. of Plant Pathology*
Scientific and Technical Association of Zaozhuang, Zaozhuang, Shandong 277300

Gao Zhengliang, *Assoc. Prof. of Plant Protection*
Tobacco Research Institute, Tobacco Company of Anhui Province, Fengyang, Anhui 233100

Hou Yaoliang, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Linqu, Shandong Province, Linqu, Shandong 262600

Jiang Guangzheng, *Prof. of Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Jiang Wuling, *Lect. of Biology*
Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084

Liang Yuancun, *MS Student of Molecular Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Li Huaifang, *Ph.D/Assoc. Prof. of Plant Protection*
Department of Plant Pathology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094

Li Qidong, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Junan, Shandong Province, Junan, Shandong 276000

Li Shidong, *Ph.D/Lect. of Plant Pathology*
Department of Piant Pathology, Beijing Agriucultural University, Beijing 100094

Li Zhenxi, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Junan, Shandong Province, Junan, Shandong 276000

Lin Yongzhu, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Yinan, Shandong Province, Yinan, Shandong 276300

Liu Aixin, *MS/Lect. of Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Liu Boxin, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Shandong Province, Linyi Branch, Linyi, Shandong 276003

Liu Changzheng, *MS/Assoc. Prof. of Biology*
Department of Basic Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Liu Guangliang, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Yishui, Shandong Province, Yishui, Shandong 276400

Liu Guangyu, *Agronomist of Plant Protection*
Tobacco Company of Shandong Province, Linyi Branch, Linyi, Shandong 276003

Liu Yanrong, *Prof. of Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Lu Peixiu, *MS/Agronomist of Plant Pathology*
Chian National Company of Tobacco Leaf Import and Export, Qingdao Branch, Qingdao 266000

Lu Shien, *MS/Lect. of Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Lu Xujing, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Junan, Shandong Province, Junan, Shandong 276600

Niu Zhufeng, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Juxian, Shandong Province, Juxian, Shandong 276500

Pan Jun, *MS Student of Molecular Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Peng Youliang, *Ph. D/Prof. of Plant Pathology*
Department of Plant Pathology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094

Qian Yumei, *Assoc. Prof. of Plant Protection*
Tobacco Research Institute, Tobacco Company of Anhui Province, Fengyang, Anhui 233100

Qing Yinping, *Ph. D/Lect. of Plant Pathology*
Department of Plant Pathology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094

Qu Jianjun, *Agronomist of Plant Protection*
The City Garden Institute of Penglai, Penglai, Shandong 265600

Sang Chuanjie, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Anhui Province, Bozhou Branch, Bozhou, Anhui 236810

Sun Lisong, *Assoc. Prof. of Tobacco Production*
Tobacco Company of Shandong Province, Jinan 251000

Sun Mingyie, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Juxian, Shandong Province, Juxian, Shandong 276500

Sun Xiaoping, *MS Student of Plant Pathology*
Institute of Plant Protection, Agricultural Academy of China, Beijing 100094

Sun Xueqin, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Bozhou, Anhui Province, Bozhu, Anhui 236810

Sun Yunda, *Agronomist of Plant Protection*
Agricultural Bureau of Linyi, Plant Protection Station, Linyi, Shandong 276001

Tian Fuhai, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Yishui, Shandong Province, Yishui, Shandong 276400

Wang Hui, *Lect. of Plant Protection*
Shandong Forestry School, Taian 271000

Wang Jinsheng, *Prof. of Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

Wang Rengcheng, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Yishui, Shandong Province, Yishui, Shandong 276400

Wang Shaohua, *MS Student of Molecular Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Wang Shaojie, *Lect. of Microbiology*
Shandong Institute of Biology, Jinan 250014

Wang Xingli, *Assoc. Prof. of Plant Protection*
Tobacco Company of Shandong Province, Jinan 251000

Wang Yanting, *Assoc. Prof. of Tobacco Production*
China National Company of Tobacco, Beijing 100053

Wang Zhifa, *Prof. of Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Xiao Qingyi, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Juxian, Shandong Province, Juxian 276500

Xu Quange, *Assoc. Prof. of Tobacco Production*
Tobacco Company of Anhui Province, Bozhou Branch, Bozhou, Anhui 236810

Xu Wenlian, *Ph.D/Lect. of Biology*
Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084

Yao Ge, *Assoc. Prof. of Plant Pathology*
Agricultural Academy of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 610066

Yang Hetong, *Assoc. Prof. of Plant Pathology*
Shandong Institute of Biology, Jinan 250014

Yang Jutian, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Yinan, Shandong Province, Yishui, Shandong 276300

Yang Xianying, *MS/Agronomist of Plant Pathology*
Tobacco Company of Shandong Province, Jinan 251000

Yin Dongsheng, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Changle, Shandong Province, Changle, Shandong 261000

Yu Jianli, *Lect. of Plant Protection*
Gongxiao School of Weifang, Weifang, Shandong 261000

Zhang Chengxi, *Assoc. Prof. of Plant Protection*
Plant Case Institute, Company of Shengli Oil Administrative Office, Dongyeng 257237

Zhang Chunling, *MS/Lect. of Entomology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Zhang Guangmin, *Assoc. Prof. of Plant Protection*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Zhang Mingsheng, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Linqu, Shandong Province, Linqu, Shandong 262600

Zhang Shouhou, *Agronomist of Tobacco Production*

Tobacco Company of Juxian, Shandong Province, Juxian, Shandong 276500

Zhang Xiansheng, *MS/Prof. of Biology*
Department of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Zhang Xiuguo, *Assoc. Lect. of Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018

Zhang Xuejun, *Ph.D/Assoc. Prof. of Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

Zhao Bing, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Yishui, Shandong Province, Yishui, Shandong 276400

Zheng Jifa, *Prof. of Plant Pathology*
Department of Plant Protection, Shandong Agricutural University, Taian 271018

Zhou Xin, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Linqu, Shandong Province, Linqu, Shandong 262600

Zhu Guangzhen, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Yishui, Shandong Province, Yishui, Shandong 276300

Zong Shulin, *Agronomist of Tobacco Production*
Tobacco Company of Shandong Province, Weifang Branch, Weifang 261000

Zong Xianhua, *Assoc. Prof. of Tobacco Production*
Tobacco Company of Linqu, Shandong Province, Linqu, Shandong 262600

写给前辈和同行的话

(代前言)

5 月 22 日是国内外著名植物病理学家、农业教育家方中达教授八十岁生日。届时,中国植物病理学会江苏省植物病理学会和南京农业大学将联合举办方先生八十寿辰纪念暨现代植物病理学术研讨会;我们赶在这次非同寻常的会议之前出版了这本书。1982 年 9 月到 1988 年 9 月我在南京农业大学读硕士、博士研究生,方先生和他的学生王金生教授作为我的导师,六年中耳提面命,教我完成了两个阶段的学业。本书扉页上的献词所要表达的就是一个学生深深的谢意。

本书的立意、结构与"大海三层"

组织编写这本书首先的一个想法,是要检讨一下我们自己的知识水平和研究水平。有一个前提:我们知道自己在这两方面都远远没能跟上以分子生物学理论和手段为背景的当代植物病理学、尤其是分子植物病理学发展的步伐。本书第一部分期望反映植物诱导抗病性研究领域及相关领域目前最活跃的话题,并吸收了与植物抗病防卫反应有关或为之基础的其他学科(如植物生理生化)的内容,作为我们构架植物诱导抗病性理论体系的一种尝试;邀请的作者都是对所写专题有较多研究的青年学者。第二部分提出利用诱导抗性防治作物病害及有关的策略、思路和例子,向人们展示这一领域的实用前景。以"植物诱导抗病性"为书名或以一部书的容量专门论述植物诱导抗病性的著作国内外还没有过;我们之所以对它辛苦经营,还因为我们怀有这样一种极大的热情:推动我国这一研究领域的发展和进步,当然这样一种尝试对我们来说肯定是一项极其艰巨的任务。

第三部分和第四部分是关于烟草赤星病和烟草诱导抗病性的研究报告。这两部分研究的背景是:烟草赤星病近 15 年来一直是制约我国烟草生产的大病害,并且越来越重,但在我们的研究之前,国内一直没有关于这个病害的完整的研究报告,此其一;其二,烟草要算农作物中最"弱不禁风"的一类,旱、涝、病、虫、雹都集中在烟叶产量形成过程的关键时期;其三,烟农付出的劳务和成本投入越来越巨大,而 15 年来烟草产值差不多维持了一个不变的数字(从 1980 年前后起平均水平一直为 500—600 元/亩);投入和收益的巨大反差在其他农产品价格持续上涨(这对农民以及社会稳定和发展来说未必是坏事)的情况表现得越来越明显,使得烟草成为近年(尤其是山东省农业大丰收的 1994 年)最不景气的农作物。因为我是一个农业科学研究人员,尤其是从沂蒙山区走出来的,一种越来越明显的刻骨铭心的感情因素在牵动着我的研究方向:我们必须为农民、为科技兴农做点实事。有这样一种说法:感情是信念的基础;还有这样一种论点:不了解、不从根本上真正关注土地、农业和农民的学者,很可能像墙头芦苇,他的理论也往往是空洞的,不管他是社会学家还是农业科学家。

因为是空白，所以略作探究就很容易获得有意义的研究结果。这就是我个人所奉行的搞科研的“层次路线”：搞科研如同“下海”，海有三层——海面的“油”，中间的水，海底的“金”；最好的路线是先“捞油”，然后下海“捞金子”，水是不喝的。本书的第三部分差不多就是这种“海面的油”，里面的研究报告主要是作为一个病害体系的生物学和病理学，我们把这些研究结果用“寄主-病菌分子和群体互作”的观点进行了综合，作为关于烟草抗赤星病诱导的机制研究的基础。第四部分主要包括三方面的研究内容：诱导抗性的生物学、机制、利用途径。在“烟草抗赤星病诱导的机制”中，现在提供的研究报告所包括的寄主-病菌互作、寄主-病菌识别和二者的导误，激发子(elicitor)和病程相关蛋白(PRP)间的关系和病理功能，及正在研究的防卫反应基因的表达调控，是我们研究所遵循的主线；我们期望今后能沿这条主线做得好一些，或更好一些，这也是上面所说“检讨自己”的一个主要目的。

由于分子植物病理学的诞生和发展，人们感到，一方面，许多“古老”的病理学现象被赋予新的内容和实质，例如 H_2O_2，甚至最简单的可溶性糖；另一方面，研究越深入，人们不能回答但迫切地想得到答案的问题就越多。所以，书的最后一篇文章标上了“启后篇”的字样，提出了我们所能想到的问题，例如，目前以强化植物、削弱或杀死病原物为主要手段的各种病害治理对策和措施，是否存在战略、思路上的问题？会带来一些什么样的后果？如工程植物和工程微生物的施放，其风险性虽已被注意到，但不是在一个短期内能全部暴露出来的，至少，我们知道有一个共同进化规律。

人不知而不愠

孔夫子的这句名言(完整的是：“人不知而不愠，不亦君子乎？”)用在我的导师方中达教授、王金生教授和所有前辈学者身上，也就是我们平常所说的“桃李无言，下自成蹊”。在这里，我是想“扩其意而用之”。费孝通老人在《读书》1994 年第四期上作一篇文就叫《人不知而不愠》，追述他的俄国老师史禄国先生的学术成就和治学精神，谈到为什么只能给史氏的书写跋而不作序，费老说：“按我为自己订的写作规矩，师承上不许越位”。我感到前辈学者除了自身的智慧和敬业精神之外，他们的这种尊师自觉和师承学风是他们能够建树卓有影响的理论、并且造就出一代又一代也是卓有成就的学生承人的一种根本。

师从名门加严师而且从师六年之久，无论如何不能不在学生身上深深地打上师承的烙印。从导师身上，我看到和努力学到了九死不悔的学术执着，王金生老师把这叫做“拚命三郎”精神。虽然我深知这本《植物诱导抗病性》水平有限，但当我在它的扉页写上“谨以此书敬祝我的导师方中达教授八十岁生日”的时候，感到可以无愧的是以下两个事实：①从1988 年我毕业后回到上了 4 年大学的母校山东农业大学工作至今，“拚命三郎”的做法一直是我的习惯，六年来差不多每天都工作十三四小时；②从 1989 年山东农业大学王智发教授(时为植保系副主任)把他招的研究生分到“烟草诱导抗病性”课题、允许我在获得硕士导师资格前就参与对研究生的指导，到 1992 年在我获得研究生导师的职称资格前学校就遴选我为硕士导师并开始“以合法的身份”指导研究生，我一直按照“拚命三郎”精神要求学生；他们个个都是努力的。由我和我的学生、同事组成的这个“烟草诱导抗病性”研究组所在的实验室，夜夜“灯火辉煌”；学生和我一样，日历上没有节假日和星期天。

我之所以要把上面这节文字写进来，是因为我相信：师承，是一股巨大的力量；我还相

信：精神，是可以开花结果的。如果作为对我的学生的期望，那就是，中国现在特别需要这种精神。

对书稿的组织情况，特作如下说明：

①第一部分的文章除我本人写的第2、第3两篇外，都是1994年约写的，主要篇目的文献资料检索到1994年7月(Agricola光盘)；②对约写的文稿，主要就引用资料的准确性、术语的统一和格式的一致等尽可能作了查考和校正，不同作者的文章之间及它们与“绪论”一文之间，对援引的同一个研究事实的概念界定和评论并不要求完全一致，相信读者会、也需要以个人的眼光来判断这些评论；③因本书的篇目涉及不同的研究层次，所以特邀了17位编委对文稿作分工审阅，除我们主编、副主编外，第一、第二部分主要由张学君、李怀方、郑继法先生，刘延荣、蒋五玲女士5人，第三、第四部分主要由刘广玉、卢绪京、朱广振、许权阁、孙学勤、张留义、张成喜、李振喜、范洪慈、林永柱、桑传杰、高明友12位先生分别审查。限于我们的水平、尤其是时间，书中错误、不足肯定难免，凡此种种，真诚感谢读者给予批评和指教。

山东农业大学陈瑞泰教授和姜广正教授，始终给予我们有利于工作的各种机会；美国学者J.Kuc教授，在诱导抗性研究中作过有益指教；北京农业大学李怀方博士，不仅以他关于植物诱导抗病性电生理学研究的权威性给予我们许多有益的指导，还为我们提供了PRP样品及最新的文献；我以前的同事、现在留学美国的谢成颂博士，美国学者F.B. Dazzo、R.N. Goodman、A.G.Matthysse诸位教授等，及时提供了有关书籍、资料；

中国科学院院士、北京农业大学裘维蕃教授，中国科学院院士、微生物研究所田波教授不弃草昧、为本书题词；方中达教授和王金生教授抽出宝贵时间作序。

董汉松

1995年1月

于山东农业大学，泰安

Preface

This treatise composes of two categories: principles, or theoretical system (Part 1), of induced resistance of plants to infections diseases and practical strategies of agricultural application of the induced resistance (Part 2); collection of research papers on brown spot as a study pathosystem (Part 3) and induced resistance (Part 4) of tobacco. For the convenience of using Chinese as native language of the authors, the whole text of topics and research papers are completed in Chinese, but accompanied with detailed summaries in topics of Parts 1 and 2, and normal abstracts in papers of Parts 3 and 4.

For the theoretical system, we have begun to organized the included topics from the start of last year, when we understood an imperative necessity to form a book special for the induced resistance, which, as a study field, is increasingly noticeable for accumulation of researches exploring into mloecular biology and being divided into different branches aimed at different mechanisms, on which the research reviews and theoretical discussions have been dispersed in different treatises about current plant pathology. This fact indicates an urgent requirement of synthesizing a work which deals uniquely with the principles the induced resistance follows, and such a requirement has also acutely felt by us in our researches on induced resistance of tobacco to brown spot. As we hoped, this motion was fit in easily with the expectation of senior and prestigious phytopathologists and biologists, such as Professors B. Tien and J. S. Wang, from them we consulted for the plan about this book, and particularly chimed in readily with ideas of the invited authors who are all young phytopathologists worked at molecular phytopothology and related fields they talked about in their responsible topics. The framework is so formed on principles of induced resistance which is expounded following a systematic sequence of scientific backgrounds, general aspects and concrete elements involved in the functional defence responses of induced resistance. For the functional elements, we specially focus the two ends of the defense responsive sequences, i. e. from the initial stimula or first signals to the genetic expression and regulation of genes for the elements including phytoalexins, PR proteins, lignification, and hydroxyproline-rich glycoproteins. Especially, some subjects of plant physiology and biochemistry are also presented, since they are considered to be close related to or be fundamental bases of plant resistance to diseases, such as ethylene, which is connected with the second messenger transmission in the resistance induction (Zhang, Part 1), and thaumatin, which is tightly correlative with PR proteins in biochemical and molecular biological properties (Liu; Dong, et al., Part 1). Target of organizing these topics is to construct the systematic system of principles for induced resistance, of course only as a try. Based on the principle system, practical strategies for applying induced resistance to control

plant diseases are generalized in Part 2.

The Parts 3 and 4 present research papers about tobacco brown spot and induced tobacco resistance. These researches have been carried out not only for exploring the mechanisms but also for reaching the paractical purposes, and carried out under the given conditions in China. No systematic report on the disease had been given before we began to study it, although the disease had been distributing country wide since 1980s. As a studied pathosystem, brown spot was researched primarily on biological and pathological characteristics, which have been comprehensively summarized in standpoints of plant-pathogen interactions (Dong and Liu, Part 3) which are thought to be an insight for both studies on the involved mechanisms and the practical strategies for application of induced resistance (Dong et al. , Part 1). In Part 4, researches on biology, mechanism and application way of induced tobacco resistance to brown spot are presented. The mechanisms have been studied to focus on two aspects, i. e. functions of the elicitors and elicitation of the induced resistance by mistake induction of the plant-pathogen contact recognition, and elicitation and function of PR proteins. We also demonstrated potential and practical ways to utilize the induced resistance by direct application form and by somaclonal variation procedures which are suggested to be able to make induced resistance conditioned by latent and not phenotypically hereditable genes be phenotypically hereditable, with expanding to effects of the induced resistance to counter pathogens of differently representative types.

The last paper in this book is marked with the words "Topics for the future", and puts forward some questions about research and practice of induced resistance and other types of plant defences against disease. As we know, when the application of recombinant DNA technique brings to light the extremely fine elements and their regulation of genetic information for plant defence, and when transgenic technique is taken as a hopeful approach to control plant disease, the both techniques bring about sequences of subjects remained to be understood, for instance, even simple phenomena or compounds such as H_2O_2 have been given new significance of so-called the secondary messenger, but people have not known the accurate transmission steps from the original signals, *via* the second messenger, to the target sequences (now known to be the cis-regulatory elements) of DNA encoding a given functional element. The other concern is that what have been evaluated risks of releasing transgenic plants and transgenic microbes can hardly be hoped to be corresponding with what they will come to being, at least because there is a role of plant-microbe coevolution.

It would have been noticed that I inscribe the dedicated sentense on the title page of this treatise. I had been among both MS and Ph. D students of Professor C. T. Fang and his more earlier student, Professor J. S. Wang, and have received their loving care as always even after I graduated from Nanjing Agricultural University 1988.

We would like to express our deep thanks to professors W. F. Chiu and B. Tien,

the academicians of the Chinese Academy of Sciences, for their encoragments to our accomplishing this book, and to Professors C. T. Fang and J. S. Wang for their inscribing the foreword. We also deeply thank Professor J. Kuc for his advice to the researches on induced tobacco resistance and sending the most current references. We are most grateful to the contributions of the invited authors as well as the support of many other individuals who provided assistance during the preparation and publication of the treatise.

Dong Hansong
Taian
Jan. 1995

目　录

序 …………………………………………………… 方中达　王金生
写给前辈和同行的话(代前言) …………………………………… 董汉松

绪论

植物对病原物的诱导免疫体系…………………………………… 董汉松(1)

第一部分　植物诱导抗病性的理论体系

植物-病原物相互作用的分子生物学 ………………………… 张学君(9)
植物-病原物识别……………………………………………… 董汉松(16)
植物对真菌毒素专化性反应的细胞和分子生物学 …………… 董汉松　卢培秀(33)
植物诱导抗病性的电生理学 …………………………………… 李怀方(44)
超氧化物歧化酶及其与植物的抗病性 ………………………… 李世东(54)
乙烯反应链中的植物生理和抗病防卫反应 …………………… 张宪省(63)
甜蛋白 thaumatin 及其基因的研究进展 ……………………… 刘长征(69)
植物诱导抗病性的进化论和遗传学基础 ……………… 董汉松　刘爱新(77)
植物诱导性抗病因子 …………………………………… 徐文联　王金生(97)
植物过敏反应与诱导抗性………………………………… 徐文联　蒋五玲(107)
植物抗病防卫反应的层次性和时序性………… 吕士恩　王　惠　董汉松(111)
激发子:病理功能、工作模式、信号传导、遗传运作 ……………………………
……………………………………………… 潘　军　董汉松　刘爱新(119)
植物保卫素的诱导………………………………… 秦引萍　彭友良(135)
病程相关蛋白(PRP)诱导发生的分子生物学……… 王少华　董汉松　郑继法(144)
细胞壁木质化作用的生物化学和分子生物学……………… 刘爱新　董汉松(160)
富羟糖蛋白(HRGP)及其抗病防卫功能 ………… 梁元存　董汉松　刘爱新等(171)

第二部分　植物诱导抗病性的利用策略

植物诱导抗病性的机制和应用途径……………………………… 董汉松(185)
植物抗病细胞工程:抗病细胞系的发生和定向筛选 ………… 卢培秀　董汉松(194)
烟草侵染性病害防治面临的困境与对策……………………… 董汉松　王智发(202)
根据植物-病原物互作控制烟草赤星病的途径 …… 董汉松　卢培秀　杨合同(208)
烟草抗病基因变异源的利用与抗病育种策略…… 董汉松　张春玲　杨合同等(216)

烟草抗病虫基因工程概况…………………………… 董汉松 张春玲 陈瑞泰(223)

第三部分 烟草赤星病:作为一个研究体系的基本研究

烟草赤星病体系中的寄主-病菌相互作用 …………………… 董汉松 刘爱新(229)
烟草赤星病菌致病力测定方法的研究…………………………… 董汉松 王智发(234)
烟草病原真菌研究中的一种选择分离技术………… 董汉松 曲建军 王智发(242)
培养条件对烟草赤星病菌生长能力的影响…………………… 王智发 董汉松(247)
培养条件对烟草赤星病菌产孢能力的影响……… 董汉松 卜晓东 杨合同等(252)
烟叶煎汁培养基中烟叶用量对烟草赤星病菌生长和产孢能力的影响 ……………
………………………………………………………… 董汉松 王继伟 王智发(256)
烟草赤星病菌致病力-生长产孢关系及不同接种体组分的作用 ……………………
………………………………………………………… 王智发 董汉松 曲建军(260)
赤星菌毒素对烟草幼苗致病特性的研究………… 董汉松 曲建军 王智发等(267)
烟草赤星病菌生长和产孢性状变异的研究……… 董汉松 曲建军 王兴利等(274)
烟草赤星病菌致病力变异的研究………………… 董汉松 曲建军 宗树林等(279)
烟草赤星病菌孢子萌发和侵染条件的研究……… 董汉松 曲建军 吕士恩等(284)
中国烟草赤星病菌致病力在地理上和品种中分化状况的研究 ……………………
……………………………………………………… 董汉松 初明光 杨合同等(290)

第四部分 烟草诱导抗病性

烟草抗赤星病诱导研究的近期进展…………………………… 董汉松 刘爱新(297)
烟草赤星病菌致病力分化和弱毒株抗性诱导作用的研究…… 董汉松 王智发(308)
烟草抗赤星病的诱导因子谱:1. 根据培养性状筛选有效的弱毒株 ………………
……………………………………………………… 董汉松 刘爱新 高明友等(312)
烟草抗赤星病的诱导因子谱:2. 化学物质 ……… 董汉松 刘爱新 杨献营等(319)
烟草抗赤星病的诱导因子谱:3. 非病原细菌的作用及田间应用效果 ……………
……………………………………………………… 董汉松 刘爱新 张成喜等(324)
烟草抗赤星病的诱导因子谱:4. 病毒因子诱导的抗病性及诱导抗性向再生植株
传递…………………………………………… 董汉松 刘爱新 孙衍坤等(331)
三类因子对烟草抗赤星病诱导作用条件的研究 ……………………………………
……………………………………………………… 董汉松 于建立 卜晓东等(337)
赤星菌弱毒株 TBA16 对烟草抗赤星病诱导作用条件的研究
………………………………………………………………… 董汉松 于建立(343)
赤星菌强、弱毒株与烟草互作的功能歧化 ………… 刘爱新 董汉松 侯成晓(349)
接触识别导误与烟草抗赤星病诱导的关系…………………… 董汉松 刘爱新(358)
病菌弱毒株和非病原细菌诱导烟草抗赤星病生化基础的研究 ……………………
……………………………………………………… 刘爱新 董汉松 高明友等(366)

三类生物来源的激发子(elicitor)对烟草抗赤星病的诱导作用 ……………………………………………………………………………… 董汉松 刘爱新 王少华(372)
抗赤星病诱导中烟草病程相关蛋白(PRP)的发生及动态 ……………………………………………………………………………… 董汉松 王少华 刘爱新等(375)
AT 毒素胁迫体细胞诱导烟草抗赤星病的研究:1. 抗毒素愈伤组织的诱导……………………………………………………………………… 卢培秀 董汉松 王智发等(384)
AT 毒素胁迫体细胞诱导烟草抗赤星病的研究:2. 从抗毒素愈伤组织再生抗病植株……………………………………………………… 卢培秀 董汉松 王智发等(391)
AT 毒素胁迫体细胞诱导烟草抗赤星病的研究:3. 再生植株抗病性的定向筛选……………………………………………………………… 董汉松 卢培秀 刘爱新等(397)
AT 毒素胁迫体细胞诱导烟草抗赤星病的研究:4. 抗病性在再生植株及其后代中的表现……………………………………………… 董汉松 刘爱新 孙衍坤等(402)
烟草赤星菌菌丝体和孢子的小规模生产………… 刘伯新 刘广玉 范洪慈等(408)
赤星菌弱毒株 TBA16 孢子制剂 PCF1 在田间控制烟草赤星病的效果及其他有益影响………………………………………………… 董汉松 孙晓平 卜晓东等(416)
抗病性诱导剂 SRS 对烟草赤星病的控制作用及其他有益影响 ……………………………………………………………………………… 董汉松 刘爱新 王彦亭等(422)
烟草诱导抗病性多抗作用的研究…………………… 刘爱新 董汉松 姚 革等(428)
诱导胁迫和无胁迫的烟草再生株及其后代对 4 种病害的反应 ……………………………………………………………………………… 董汉松 刘爱新 张留义等(434)
烟草花叶病、黑胫病、低头黑病产量产值损失估计研究 ……………………………………………………………………………… 刘延荣 董汉松 宗树林等(439)
烟草赤星病损失估计模型的建立方法…………………………… 董汉松 刘延荣(445)

启 后 篇

关于植物-病原物互作和病害控制的思考 …………………… 董汉松 徐文联(451)

CONTENTS

Preface

Introduction

On acquired immunity system for countering pathogens in plants ········ Dong Hansong(4)

Part 1. Principles of Induced Resistance against Diseases in Plants

Molecular biology of plant-pathogen interactions ········ Zhang Xuejun(14)
Plant-pathogen recognition ········ Dong Hansong(29)
Molecular and cellular interactions of plant hosts with mycotoxins ········ Dong Hansong and Lu Peixiu(41)
Electrophysiology of induced resistance of plants to diseases ········ Li Huaifang(52)
Superoxide dismutases and plant disease resistance ········ Li Shidong(62)
Ethylene-conditioned response sequences: its relation with plant defence against diseases ········ Zhang Xiansheng(68)
Advances in studies on molecular biology of thaumatin ········ Liu Changzheng(75)
The co-evolutionistic and genetic bases of induced resistance ········ Dong Hansong and Liu Aixin(89)
Functional response elements involved in induced resistance of plants to diseases ········ Xu Wenlian and Wang Jinsheng(106)
Hypersensitive reaction as related to induced diseases resistance in plants ········ Xu Wenlian and Jiang Wuling(111)
Orderliness and timeliness in expression of disease resistance in plants ········ Lu Shien, Wang Hui and Dong Hansong(116)
The elicitors: their function, working model and process, and molecular genetics in plant defence against diseases ········ Dong Hansong, Pan Jun and Liu Aixin(133)
Induction of phytoalexins ········ Qin Yenping and Peng Youliang(143)
Molecular biology for induction of pathogenesis-related proteins ········ Dong Hansong, Wang Shaohua and Zheng Jifa(157)
Lignification and related structural factors for the plant defence ········ Liu Aixin and Dong Hansong(169)
Hydroxyproline-rich glycoproteins as related to disease defence of plants ········

…………………………………… Dong Hansong, Liang Yuancun, Liu Aixin et al. (181)

Part 2. Practical Strategies for Applying Induced Resistance to Control Plant Diseases

Induced resistance against diseases in plants: mechanisms and approaches for disease control …………………………………………………………… Dong Hansong(192)

Cellular engineering for disease resistance in plants: elicitation and selection of resistant somaclones ………………………………… Lu Peixiu and Dong Hansong(200)

Difficulties and strategies in controlling infections diseases of tobaccos ………………… ………………………………………………………… Dong Hansong and Wang Zhifa(206)

Potential and practical approaches for control of tobacco brown spot based on the host-pathogen interactions …… Dong Hansong, Lu Peixiu and Yang Hetong(215)

Genetic variation sources and breeding strategies for developing tobacco with disease resistance ……………………………………………………………………… …………………………… Dong Hansong, Zhang Chunling, Yang Hetong et al. (222)

Interesting genes used in genetic engineering for disease and insect resistance in tobacco ……………………… Dong Hansong, Zhang Chunling and Chen Ruitai(228)

Part 3. Tobacco Brown Spot as the Study System

Interactions between the host and pathogen in tobacco brown spot pathosystem …… ………………………………………………………… Dong Hansong and Liu Aixin(233)

Study on methods for indentifying pathogenicity of tobacco brown spot pathogen …… ……………………………………………………… Dong Hansong and Wang Zhifa(241)

Studies on a selective isolation method for fungal pathogens of tobacco ……………… …………………………………… Dong Hansong, Qu Jianjun and Wang Zhifa(246)

Effects of culture conditions on growth capability of *Altrenaria alternata* (Fr.) Keissler …………………………………………… Wang Zhifa and Dong Hansong(251)

Effects of cultural conditions on sporulation of tobacco brown spot pathogen ……… ………………………………… Dong Hansong, Bu Xiaodong, Yang Hetong et al. (255)

Effects of leaf amounts in tobacco leaf extract media on growth and sporulation of *Alternaria alternata* …………… Dong Hansong, Wang Jiwei and Wang Zhifa(259)

Pathogenicity-biology relationships influenced by inoculum components in *Alternaria alternata* ………………………… Wang Zhifa, Dong Hansong and Qu Jianjun(265)

Fast responses of tobacco to toxin produced by *Alternaria alternata* in relation with identificaton for resistance of tobacco cultivars to brown spot ……………………… …………………………………… Dong Hansong, Qu Jianjun, Wang Zhifa et al(373)

Study on variation of biological properties of *Alternaria alternata* in cultural and

inoculating process ………… Dong Hansong, Qu Jianjun, Wang Xingli et al. (278)
Observations about pathogenicity variation of tobacco brown spot pathogen …………
…………………………………… Dong Hansong, Qu Jianjun, Zong Shulin et al. (283)
Study on conditions for sporulation and invasion to host by tobacco brown spot pathogen ………………………… Dong Hansong, Qu Jianjun, Lu Shien et al. (289)
Occurrence in tobacco cultivars and geographical distribution of *Alternaria alternata* in China ……………… Dong Hansong, Chu Mingguang, yang Hetong et al. (295)

Part 4. Induced Resistance of Tobacco to Brown Spot and Other Diseases

Recent advances in studies on induced resistance of tobacco to brown spot ……………
…………………………………………………………… Dong Hansong and Liu Aixin(301)
Pathogenicity differentiation of *Alternaria alternata* and induced resistance of tobacco to brown spot by the hypovirulence strains ………………………………………………
………………………………………………………… Dong Hansong and Wang Zhifa(311)
Inducers of tobacco resistance to brown spot: 1. selecting *Alternaria alternata* hypovirulent strains as inducer based on their culture properties ……………………
……………………………… Dong Hansong, Liu Aixin, Gao Mingyou, et al. (317)
Inducers of tobacco resistance to brown spot: 2. chemicals ……………………………
……………………………… Dong Hansong, Liu Aixin, Yang Xianying, et al. (323)
Inducers of tobacco resistance to brown spot: 3. nonpathogenic bacteria and their application in fields ……… Dong Hansong, Liu Aixin, Zhang Chengxi, et al. (330)
Inducers of tobacco resistance to brown spot: 4. virus-induced resistance and its transferability to the regenerated plants and their progenies *via* tissue culture ……
………………………………… Dong Hansong, Liu Aixin, Sun Yankun et al. (336)
Conditions of 3 inducers to elicit tobacco resistance to brown spot ……………………
………………………………… Dong Hansong, Yu Jianli, Bu Xiaodong et al. (342)
Improvement of conditions for increasing effects of the hypovirulent strain TBA16 of the pathogen (*Alternaria alternata*) to induce tobacco resistance to brown spot
…………………………………………………………… Dong Hansong and Yu Jianli(347)
Function divergence of host-pathogen interactions by virulent and hypovirulent strains of the pathogen in tobacco brown spot ……………………………………………
………………………………… Liu Aixin, Dong Hansong and Hou Chengxiao(354)
Induction of mistakes in the contact recognition as related to the induced host resistance in tobacco brown spot ……………… Dong Hansong and Liu Aixin(361)
Cell wall components of nonpathogenic bacteria and hypovirulent *Alternaria alternata* are responsible for induction of tobacco resistance to brown spot …………
………………………………… Liu Aixin, Dong Hansong, Gao Mingyou et al. (369)
Elicitation of tobacco resistance to brown spot by three kinds of biotic elicitors ……

…………………………………… Dong Hansong, Liu Aixin and Wang Shaohua(374)
Occurrence of pathogenesis-related proteins during elicitation of tobacco resistance to brown spot ……………… Dong Hansong, Wang Shaohua, Liu Aixin et al. (382)
Induction of tobacco resistance to brown spot *via* somaclone stress with AT-toxin: 1. somatic induction for toxin resistance ……………………………………………………………………………………… Lu Peixiu, Dong hansong, Wang Zhifa et al. (390)
Induction of tobacco resistance to brown spot *via* somaclone stress with AT-toxin: 2. regeneration of disease-resistant plants ……………………………………………………………………………………… Lu peixiu, Dong Hansong, Wang Zhifa et al. (395)
Induction of tobacco resistance to brown spot *via* somaclone stress with AT-toxin: 3. directed selection for the disease resistance ……………………………………………………………………………… Dong Hansong, Lu Peixiu, Liu Aixin et al. (401)
Induction of tobacco resistance to brown spot *via* somacone stress with AT-toxin: 4. resistance expression in the regenerated plants and their somaclone progenies …………………………………… Dong Hansong, Liu Aixin, Sun Yankun et al. (407)
Laboratory scale production of mycelia and spores of *Alternaria alternata* for research and practice purposes ……………………………………………………………………………………………… Liu Boxin, Liu Guangyu, Fan Hongci et al. (411)
Control of brown spot by induced resistance in tobacco: 1. field application of PCF1, a preparation from conidia of *Alternaria alternata* strain TBA16 ……………………………………………… Dong Hansong, Sun Xiaoping, Bu Xiaodong et al. (421)
Control of brown spot by induced resistance in tobacco: 2. preparation SRS2, its functions to control the disease and to improve qualitative and economic properties of the cured leaves ………… Dong Hansong, Liu Aixin, Wang Yanting et al. (427)
Tobacco resistance to fungal, bacterial, and viral diseases induced by 5 factors ……………………………………………… Liu Aixin, Dong Hansong, Yao Ge et al. (432)
Resistance to 4 diseases in tobacco somaclones NC89-TT regenerated from AT-toxin stress tissue culture, and NC89-V1 from no stress tissue culture of virus-induced plants ……………………………… Dong Hansong, Liu Aixin, Zhang Liuyi et al. (438)
Loss estimates of tobacco leaf yield and output value due to mosaic, black shank, and black lowering diseases ……………………………………………………………………………………… Liu Yanrong, Dong Hansong, Zong Shulin et al. (444)
Modeling method for estimating tobacco production losses caused by brown spot disease ……………………………………………… Dong Hansong and Liu Yanrong(449)

Topics for the future

Questionary considerations and perspectives on plant-pathogen interaction and plant disease control ……………………………………………… Dong Hansong, Xu Wenlian(455)

绪　论

植物对病原物的诱导免疫体系

董汉松

一、“诱导免疫体系”的说法比“诱导抗性”更贴切

在本书试图构架植物诱导抗病性的理论体系时，我们感到诱导抗性并不是一个最贴切的术语。首先，诱导抗性是一种试验现象，阐述这一现象的同义术语先后有获得免疫、获得抗性、交叉保护、干扰、诱导抗性等[1,2]。诱导抗性一词之所以被广泛接受，是因为它能包含由各种因子诱发的植物抗病害防卫，即病害减轻这一现象。但它的发生有一套系统的机制，就是从基因控制到抗病防卫功能因子的作用，形象地说是参加与病原物战斗的过程；功能因子间是一个纵横交错而非直链式的链-环反应系统[3-5]，构成了植物的诱导免疫体系。第二，作为一种抗病机制类型，诱导抗性与预存（固有、先天等）抗性相对应，都属于“寄主抗性”的范畴，与非寄主抗性不是同位概念；非寄主抗性既有预存机制，也有诱导机制[6]。它们之间的差别主要在于控制抗病性的基因表达的时序性，而基因表达后，抗病防卫的功能因子大致相似。最后，植物诱导抗病性无论在发生过程、形式、机制上，还是在功能上，都与高等动物获得免疫有很多可比性。

总之，认为“诱导免疫体系”的说法比“诱导抗性”更贴切，主要是从术语的包容性、不可替代性及它所包括的功能的广泛（生物类群）的可比性 3 方面来理解的。

二、分子植物病理学是一个上位学科

植物诱导抗病性的理论体系的构架依赖于这样的学科背景：①诱导抗病性现象已被分成或对应于不同的机制（防卫功能因子），用分子生物学和有关交叉学科的手段加以研究，积累了丰富但尚未系统化的结果[4,5,7,8]；②植物生命活动所遵循的基本规律，尤其是其中某些因子在植物生命中的作用机制，或者是作为植物抗病防卫反应链的一种因子，或者是防卫反应发生的基础；对其中有些因子的研究可以成为抗病防卫研究的范式；③植物-微生物互作是这种研究的理论主线，它含 3 方面的内容：共同进化与植物-病原物互作的演化、形成，基因对基因互作，基因对基因互作通过防卫功能 因子控制植物抗病反应的过程[8,9]。

基因对基因概念提出之后，经历了适用性的被怀疑和重新证明的过程。它在分子植物病理学中的“被再次发现”指 3 点涵义：①狭义上，植物显性抗病（R）基因与病原物隐性无毒（*avr*）基因间的互作，引导非亲和抗病性[9]；②它的另外两种表达形式，即 R 或 *avr* 基因

任何一方产物的缺少导致感病性，及植物感病基因产物与病原物毒性(*vir*)基因产物间的互作导致感病性；③互作中的基因是特定的核苷酸序列，每一个序列单元是特定功能因子(如病程相关蛋白，PRP)基因家族中的一员，家族中的各个成员构成孟德尔基因中的位点。

对植物-病原物互作的贴切理解至少源于"染病体"(aegricorpus)概念的提出[11]，到80年代前后，Ellingboe和他的学生(如Gebriel)对基因/基因关系广泛适应性的持续论述成为上述基因对基因关系3点涵义的重要部分，直至阐述从基因互作到它的生化表达的二聚体模式(dimer model)[12]和离子通道防卫模式(ion-channel defense model)[13]的提出。值得一提的是，激发子-受体分子互作模式(elicitor-receptor model)不仅一直有它的适用性，而且是后两个模式产生的基础。

三、层次性和时序性是诱导免疫体系的链条

我们在第一部分有关篇目(吕士恩等，植物抗病防卫反应的层次性和时序性；梁元存等，富羟糖蛋白及其抗病防卫功能)中分别作了两个示意图，说明植物抗病防卫机制的链-环反应。可以拿自行车的传动装置作比喻：中轴的大牙盘是通向基因控制的一端，后轮的小牙盘的各个轮齿相当于抗病防卫的功能因子；层次性(orderliness)类似大、小牙盘上有序排列的轮齿，而时序性(timeliness)则是传递动力的链。层次性和时序性既包括在"大牙盘"上的基因表达方式，又包括在"小牙盘"功能因子的有序"登台表演"中；基因的启动是一个由一级信号刺激经次级信使直接指向基因靶序(target sequence，TS)的过程，而这个一级信号就相当于用在自行车脚踏板上的驱动力。如果读者把我们所指示的篇目联系起来看，这个比喻就不显得太抽象，但是，抗病防卫链-环反应要复杂、交错得多，远不是同一个平面上的大、小牙盘和链的关系。

防卫反应功能因子是指直接参与抵抗病原物侵染和致病作用的分子或事件，它被分成两类：一是防卫反应的功能分子(functional defence molecules)，主要包括植物保卫素、病程相关蛋白、富羟糖蛋白、硫堇、抑菌蛋白质等；二是防卫反应的功能事件(functional response events)，主要有细胞壁木质化过程、与氧化-还原和活性氧-自由基清除有关的酶系统、参与植物保卫素合成的酶，如查尔酮系列酶，以及其他参与结构抗性和生化抗性的酶，如苯丙氨酸氨裂解酶、多酚氧化酶等(对这些酶的作用，参见Goodman等，1986[14])。第一部分"抗病防卫反应的功能因子"中的篇目是根据菜豆悬浮培养的细胞中这些因子诱导发生的先后顺序排列的；而把"激发子"排为其外的首篇，是想指示上述链条关系：它是植物抗病防卫链-环反应的首端。

四、诱导免疫体系的功能说明它可以不同途径用于植物病害的控制

如果把植物诱导抗病性放在生物类群类似功能上作比较，我们感到有必要把董汉松在《植物诱导抗病性的机制和应用途径》一文中提出的论证作如下归纳：①在植物-病原物互作的识别阶段，无论是互作遵循的机制、过程还是对它们的研究范式，由寄主的pathogenesis(病程、发病机制)和病原物的pathogenicity(致病机制)互作规定的寄主抗病反应，

在动物(包括人)-病原物互作和植物-病原物互作中都是相似的[15,16],Roberts,1992[16]),例如我们已经提到的植物识别子(cognor)及富羟糖蛋白(HRGP)的发生;②防卫功能因子"登台表演"的机制相似,例如已提到的人α干扰素及未提到的多肽生长因子(参见:军事医学科学院基础医学研究所,多肽生长因子分子生物学理论与技术学习班讲义,1994)与PRP在非专化性方面的共同性;③功能相同,即都是抵抗病原物、减轻发病。在此需补充两点:第一,植物抗病防卫反应因子的控制基因对刺激信号"分工负责"的分子结构和调控机制,说明对诱导抗性并不能一般地认为缺少专化性,这一点可以与动物抗体决定簇编码基因的细致分工相类比;第二,从寄主-病原物共同进化的角度估计,植物-病原物和动物(人)-病原物的基因互作可能遵循相似的机制。我们相信,如果详细查证当代医学的有关研究,以上类比肯定会获得更多的证据,但是,这已经超出了我们的能力、尤其是时间和精力。

植物诱导抗病性的利用策略应该根据诱导抗性发生的机制和层次性来设计,现已被提出或已经实施的利用途径[5,17],依据的基本原理主要是:①根据植物-病原物互作的阶段性和植物抗病防卫链-环反应的层次性和时序性,强化某种功能因子并做到像喷洒农药一样直接应用;②希望发现TS或控制抗病性的"开关",用一种外源信号诱导植物对不同病原物的抗病性;③通过细胞工程和基因工程方法,把表型不遗传的诱导抗性改造为表型可遗传[18,19]。但这其中既有理论上的也有实用上的问题,需进一步研究(董汉松等,启后篇)。

参 考 文 献

[1] 张元恩,植物诱导抗病性研究进展,生物防治通讯,1987,3(2):88-90。

[2] Kuc,J.,Induced systemic resistance in plants to diseases caused by fungi and bacteria, In The Dynamics of Host Defence (Bailey,J. A.,Deverall,B. J.,eds.),Sydney,New York:Academic Press,1987,191-221.

[3] Bol,J. F.,Linthorst,H. J. M.,Cornelissen,B. J. C.,Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection,Annu. Rev. Phytopathol.,1990,**28**:113-138.

[4] Blo,J. F.,Structure and expression of plant genes encoding pathogenesis-related proteins,In Plant Gene Research: Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes (Verma,D. P. S.,Goldberg,R. B.,eds.), Wine ,New York:Springer-Verlag,1988,201-221.

[5] Madamanchi,N. R.,Kuc,J.,Induced systemic resistance in plants,In The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals (Cole,G. T.,Hoch,H. C.,eds.),New York:Plenum Press,1991,347-362.

[6] Hadwidger,L. A. Nonhost resistance in plant-fungal interactions, In Molecular Signals in Plant-Microbe Communications (Verma,D. P. S.,ed.),Boca Raton:CRC Press,1992,85-96.

[7] Scholtens-Toma,I. M. J.,Joosten,M. H. A. J.,De Wit,P. J. G. M.,Appearance of pathogen-related proteins in plant hosts:relationship between compatible and incompatible interactions,See Ref,5, 247-266.

[8] 王金生,寄主-病原物互作,植物病理学报,1992,**22**:289-292。

[9] Gabriel,D. W.,Rolfe,B. G.,Working models of specific recognition in plant-microbe interactions,Annu. Rev. Phytopathol.,1990,**28**:365-391.

[10] Ellingboe,A. H.,Changing concepts in host-pathogen genetics,Annu. Rev. Phytopathol.,1981,**19**:125-143.

[11] Loeggering,W. Q.,The relationship between host and pathogen in stem rust of wheat,Hereditals Suppl.,1966,**2**:167-177.

[12] Ellingboe,A. H.,Genetical aspects of active defence,In Active Defense Mechanisms in Plants (Wood,R. K. S.,

ed.),New York:Plenum Press,1982,179—192.
[13] Gabriel,D. W. ,Loschke,D. C. ,Rolfe,B. G. ,Gene-for-gene recognition:the ion channel defense model,In Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions (Palacios,R. ,Verma. D. P. S. ,eds.),St. Paul,MN:APS Press, 1988,3—14.
[14] Goodman,R. N. ,Kiraly,Z. ,Wood,K. R. ,The Biochemistry and Physiology of Plant Disease,Columbia:Univ. of Missouri Press,1986.
[15] Costerton ,J. M. ,Marie,T. J. ,Cheng,K. -J. ,Phenomena of bacterial adhesion, In Bacterial Adhesion (Savage, D. C. ,Fletcher,M. ,eds.),New York:Plenum Pub. Corp. ,1985,3—43.
[16] Roberts,D. W. ,Fungal-host interactions,Opportunities for interdisciplinary research,See Ref. 5,the Introduction.
[17] Kuc,J. ,Expression of latent mechanisms for resistance to blue mold and other disease in tobacco,In Inf. Bull. 9the Tob. Sci. Cong. ,Guangzhou,1988,25—40.
[18] James,J. R. ,Tweedy,B. G. ,Newby,L. C. , Efforts by industry to improve the environmental safety of pesticides,Annu. Rev. Phytopathol. ,1993,**31**:423—439.
[19] Kuc,J. ,Induced systemic resistance—A nonpesticide technology for disease control in plants, In New Directions in Pesticide Research,Development,Management,and Policy (Weigmann,D. L. ,ed.),Blackshurg,VA:Virginia Water Resour. Res. Center,1993,511—518.
[20] Coplin,D. L. ,Plasmids and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria,Annu. Rev. Phytopathol. , 1989,**27**:187—270.
[21] Strobel,N. E. ,Kuc,J. ,Development of environmentally safe chemicals as inducers of disease resistance in crop plants,See Ref. 20, 519—526.

ON ACQUIRED IMMUNITY SYSTEM FOR COUNTERING PATHOGENS IN PIANTS

Dong Hansong

Phenomena of induced resistance of plants to infectious diseases were discovered at the first decade of this century,and have awared great development in extent of being studied. Among the terms used,such as acquired immunity,acquired resistance,interference,cross protection,and induced resistance,the last one is widely accepted since it can contain the fact that an originally susceptible plant can be elicited to become resistant to a disease by divergent factors. While,elicitation of induced resistance follows a set of systematic mechanisms ,as synthesized by Bol et al. (1990). The induction of enzymes from the phenylpropanoid pathway,oxidative enzymes,and hydroxyproline-rich glycoproteins(HRGP)is partially related to cell wall modifications that lead to the formation of a physical barrier to further spread of the pathogern from the site of infection. Peroxidases are involved in the polymerization of alcohol derivatives of aromatic compounds such as coumaric,ferulic,and sinapic acid into lignin and suberin and cross-linking of these polyphenols to extensin molecules from the cell wall matrix. In addition to inducing a defense aimed at localizing the pathogen,various antimicrobial compounds are syn-

thesized. These compounds include phytoalexins synthesized along branches of the phenylpropanoid pathway leading to furano-coumarins of isoflavonoids, hydrolytic enzymes that may attack polysaccharide components from cell walls of the pathogen, and proteinase inhibitors that specifically block the digestive enzymes of herbivores. Collectively, these induced reactions are thought to contribute to an active defense mechanisms of the plant known as "induced resistance". Indeed, these events take place only after plant genes, often called latent genes, for induced resistance are activated, and compose of the acquired immunity system of plants to counter pathogens. Such a acquired system is a complicated and cross-linked responsive chain and network, in which the secondary messengers are usually needed to continue the stimulus by primary signals.

W. call the factors described by Bol et al. as functional defence elements (FDEs) which are directly in fighting the pathogens. Then we distinguish two categories of these elements. The first one is called functional defence molecule, including phytoalexins, pathogenesis-related (PR) proteins, HRGPs, thionine and other antimicrobial compounds, which are demonstrated to contribute to the disease defence of plants by direct impeding pathogens at molecular status. The second category of the functional defence elements is called functional defence event, mainly including lignification process, elicitation of enzymes such as peroxidases leading to fortification of plant cell walls and enzymes such as superoxide dismutases related with removal of active oxygen species and release of H_2O_2 putatively taken as a secondary messenger in induced resistance, as well as enzymes in phytoalexin synthesis such as those of chalcone system (Madamanchi and Kuc, 1991; Scholtens-Toma et al., 1992).

It is well-known that the functional defence elements come into their functions at a highly ordered sequence. For this , we give a definition of the orderliness and timeliness to contain the meaning of spatial and temporal orders of FDEs, and they are obeyed not only in the functional process of the elements but also in the activation of the so-called latent genes. Elicitation of induced resistance is dependent on the mechanisms at which plants are induced to become incompatible- from origial compatible-interactions with their pathogens. Such a transformation could be deduced to be accomplished at two levels of the gene activation (Dong and Liu, Part 1). First, the R gene of plants is activated to express encoding a product with function of triggering the responsive defence gene encoding the functional defence elements, which is putative but no direct evidence has been obtained for the R gene . Secondly, genes originally controlling specifically compatible recognition may be induced to become the form of gene-for-gene incompatibility (Gabriel and Rolfe, 1990), which is less putative and lack of proof. Whatever is actually being, the speed and magnitude with which genetic information for resistance mechanisms is expressed are considered to be critical for elicitation of induced resistance (Kuc, 1988; Madamanchi and Kuc, 1991). No need is for discussing the orderliness and timeliness in the functional elements, which are dealed with in the last 4 topics of Part 1 at the time

sequences found in cultured cell of bean. Out of them, the elicitors are discussed in advance to indicate the responsive chain and network, in which the elicitors are the first end.

Molecular plant pathology is taken as the up-layer subject for principles or theoretical system of induced resistance. Plant-microbe interactions are taken as a leading line in our developing the discussions, and followed in three respectives: (1)formation of plant-pathogen interactions in the plant-microbe coevoluti+on (Dong and Liu, Part 1); (2) gene-for-gene relations of plants with pathogens, and (3) process of the functional elements to take roles in the plant defence, conditioned by the gene-for-gene relationship. Representative topics include plant-pathogen recognition and interactions between the host specific toxins of fungal pathogens and their hosts.

We fell it is important to mention the gene-for-gene concepts in molecular plant pathology. After about 50 years of modifications and developments of the concept (Ellingboe, 1981; Gabriel and Rolfe, 1990), the gene-for-gene relation is defined as three characterisitics: (1)in strict sense, it is the R gene-for-*avr* gene interactions; (2)susceptibility can be resulted from lack of any products of the R and *avr* genes, and from the interaction between S susceptible genes of plant and *vir* genes of pathogens, and (3)the genes are corresponded to the nucleotide sequences as functional units clustering to form special gene family, such as different PR gene families, which composes of Mendelian loci. For biochemical expression of the gene-for-gene interactions, three models are greatly contributed to understanding plant-pathogen interactions which are continuously developed from the concept of aegricorpus (Loegering, 1966); they are elicitor-receptor, dimer, and ion-channel defense models (Gabriel and Rolfe, 1990). Being necessary to point out, the topic of electrophytopathology is beneficial at least to understanding the ion-channel defense model.

Several ways have been suggested for applying induced resistance to control plant diseases (Kuc, 1988; Madamanchi and Kuc, 1991). They are based on three principles: (1)direct application of the inducers of elicitors which are able to fortify certain steps or elements in the responsive defence chain; (2)transformation of induced resistance which is usually not hereditable to be hereditable by cellular and/or genetic engineering methods, and (3)finding and triggering the TS which is expected to be common for and activated to protect plants from different diseases. The last way is most attractive and not fantastic, since responsive elements have been found to be carried by special genes, such as those encoding PR proteins and HRPGs.

We are greatly interesting at the comparability of induced resistance in plants with acquired immunity in high animals. First, similar mechanisms are followed by plant-pathogen and animal-pathogen recognitions which are the first stage to sward plant a

disease defence in plant-pathogen interactions (Roberts, 1992; Costerton, 1985). Secondly, comparability can be found in the coming-into functions by both plant and animal resistance mechanisms, such as PR proteins and interferons, both of which are characterized by lack of specificity in countering pathogens. In the third aspect, phenotypical roles are the same in induced resistance in plants and acquired immunity in animals, both of which can reduce impairment by pathogens. The next comparative aspect is that the similar mechanisms could exist in both plant-pathogen and animal-pathogen coevolution, indicated by the divergence of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* from a same ancestor (Coplin, 1989, the Concluding Remarks part), and by conservativeness in genes encoding the funcitonal elements in plant defence, as for PR proteins and HRGPs. Lastly, functional division and special responsibility in molecule organization and expression regulation of genes for PR proteins and HRGPs, for examples, do not suggest that it is reasonable to consider generally induced resistance as lack of specificity.

Thus, people are sufficiently reasonable to take the application of induced resistance as an effective and hopeful strategy of disease control, not only for the high effects of induced resistance testified in laboratory, but also for the public requirement for safe management of plant diseases (James et al., 1993; Kuc, 1993; Strobel and Kuc, 1993). For this practical purposes, there are still limitation and dilemma which are correlated with and depended on the problems existing in the theoretical studies on induced resistance, remained to be further researched (Dong, Topics for the future).

第一部分　植物诱导抗病性的理论体系

植物-病原物相互作用的分子生物学

张学君

在近 20 年左右时间里，尤其是 80 年代以来，关于寄主-病原物相互作用的分子生物学研究方兴未艾。许多以前从事根瘤菌研究或植物分子生物学研究的实验室都相继转向这一领域。其原因有两大方面，一是得益于分子生物学中许多关键性理论与技术的重大进展，如 DNA 重组技术，基因鉴定、分离与克隆技术，基因转移技术，载体的修饰和构建技术以及基因表达与调控技术等；另一方面是植物病害系统作为植物分子生物学研究的典型材料，既有较大的理论意义，又具重要的实践意义。目前已在几个重要的植物-病原物系统中取得了令人振奋的进展。

植物-病原物相互作用，就是在一定的条件下植物发病过程中寄主和病原物在生理、生化及遗传水平上相互影响，从而决定寄主发病或不发病，发病轻还是发病重。它主要是从植物-病原物相互关系的角度研究病理过程的机制。植物与病原物相互作用的分子生物学是研究相互作用中病原物致病相关基因及其产物，植物抗病相关基因及其产物，以及它们的表达调控机制。

一、基因对基因概念

基因对基因(gene-for-gene)概念是在 Flor(1947，1955)[1,2]对亚麻锈病(*Melampsora lini*)系统的遗传学研究基础上建立的。他采用孟德尔遗传学方法研究抗、感品种杂交后代的群体反应，从而推定寄主和病原物的基因型及其相互关系。他假定：如果寄主中有一个调节(condition)抗病性的基因，那么病菌中也有一个相应的基因调节对寄主的致病性；寄主中如有 2 个或 3 个基因决定(determine)抗病性，那么病菌中也有 2 个或 3 个相应的决定无毒性的基因。在这里寄主的抗病基因(R)和病菌的无毒基因(V＝*avr*)是显性的，而寄主的感病基因(r)和病菌的毒性基因(v＝*vir*)是隐性的。寄主的抗病表型需要寄主中决定抗病性的基因和病菌中决定无毒性的基因相互作用，也就是说寄主的抗病性或不亲和性是病菌和寄主特异性相互作用的结果。因而认为抗病性是主动过程，而感病性是由于寄主缺乏抗病基因或病菌缺乏无毒基因而表现的被动现象。

最初基因对基因概念涉及的大多是专性寄生菌所致的病害，如锈病、白粉病等，后来发现在镰刀菌等兼性寄生菌所致病害中也有这种关系。目前已证明存在基因对基因关系的病害包括真菌病害、细菌病害、病毒病害、线虫病害、寄生性种子植物病害甚至虫害；在微效基因相互作用中也可能存在基因对基因关系，这时所表现出来的抗病性是若干微效

基因相互作用效应的叠加。

大多数寄主-病原物相互作用关系符合寄主抗病基因与病原菌无毒基因互为显性遗传的规律，但在水稻抗白叶枯病、大麦抗白粉病、燕麦抗冠锈病等情况下也存在隐性抗病基因；大多数基因对基因关系是一对一的，但也有一个抗病基因抗 2 个病菌小种的情况，如玉米抗锈基因 RP3 控制着对玉米柄锈菌(*Puccinia sorghi*)2 个小种(901ab，933a)的抗性；在亚麻锈病中，有些抗病基因如 M_1 和 L_1 与病菌中 2 个等位基因互作，A/a 决定无毒/毒性，I/i 决定对无毒基因的抑制作用，只有当抑制基因为纯合隐性 i/i，病菌基因型为 i/i 和 A/A 或 i/i 和 A/a 时，含 M_1 和 L_1 品种才表现抗病；相反，若抑制基因显性 I/I 或 I/i，则无毒基因被抑制，相互作用结果为亲和即表现感病反应。在马铃薯晚疫病(*Phytophthora infestans*)中也存在类似关系。在产生寄主专化性毒素的病害中，寄主与病原物特异性相互作用的结果是导致亲和性。在这里病菌基因的产物是毒素，而寄主基因的产物是理论上的受体，如此，这一关系中感病性是主动的。但是，如果我们认为抗病品种可以降解毒素或对毒素的作用具有自我修复机制，则这一病害就符合抗性是主动过程的规律。

二、互作模式

基因对基因概念的提出，引发了人们对植物-病原物相互作用的分子基础的讨论，提出了许多模式或假说[3-8]。先是把寄主和病原物的相互作用比喻为锁钥关系，病原物中有钥匙，寄主中有锁。钥匙上的缺刻，一类决定基本亲和性，一类决定特异性。有的病原物同时具备二类缺刻，它们与寄主的关系是不亲和的；有的则只具决定基本亲和性的缺刻，它们与寄主的关系是亲和的。Ellingboe(1982)[3]把这种关系具体化为二聚体模式，认为病原物的无毒基因产物与互补的寄主抗病基因产物有高度亲和性，形成二聚体后对病菌有非特异性抑制作用。后来，Callow(1987)[6]和 Keen(1990)[5]等又相继提出激发子-受体模式。这一模式可以看成是二聚体模式的补充。这一模式认为病菌的不亲和小种产生特异性激发子，其结构由无毒基因决定。激发子与互补的抗病基因产物即受体有高度亲和性。但这种特异性识别的本身并无抗病效应，还需通过植物中基因有选择地表达和积累植物保卫素等抑菌物质后才能抑制病菌的发展。二聚体模式仅主张无毒基因产物和抗病基因产物直接相互作用，而后者则不排除病菌无毒基因的次生产物也可以作为识别因子。例如，原来认为无毒基因产物是糖苷酶，它并不直接与互补的抗病基因产物发生作用，而是通过它的作用决定病菌细胞表面独特的碳水化合物结构，这些在结构上千变万化的碳水化合物才是直接与抗病基因产物相互作用的因子。事实上，目前已经证实激发子除少数是蛋白质或多肽外，大部分是糖蛋白或葡聚糖类化合物。关于寄主-病原物相互作用分子机制的研究关键是分离和鉴定抗病基因产物，即受体。在玉米小斑病菌毒素(T 毒素)和维多利亚长蠕孢毒素的受体研究中取得明显进展，将受体定位在寄主细胞膜上。在燕麦中，Vb 调节对 *Helminthosporium victoriae* 毒素的敏感性，Pc-2 是对 *Puccinia coronata* 产生过敏抗性反应的位点。两者在同一个位点，Vb/Pc-2 基因编码同一个受体，但对两种病菌的反应截然不同。激发子-抑制子-受体模式是激发子-受体模式的特殊情况，其中激发子和抑制子都是由病菌产生的。抑制子的作用是与激发子竞争寄主细胞原生质膜上的受体。激发子没有专化性，与寄主的特异性相互作用由病菌的抑制子和寄主的受体共同决定。马铃

薯晚疫病菌产生的抑制子为β-1,3-葡聚糖。从大雄疫霉大豆变种中鉴定的抑制子为一种糖蛋白,碳水化合物部分是甘露糖。近年有人提出离子通道模式[12],认为无毒基因产物(或次生产物)与寄主膜上的蛋白受体结合时,使受体蛋白的三级结构发生改变,从而使邻近的离子通道活化,细胞质内离子(如Ca^{2+})浓度提高并引起细胞内的进一步生理生化变化。细胞质钙离子浓度通常比细胞外和液泡内的Ca^{2+}浓度低10 000倍,细胞质中Ca^{2+}浓度稍有增加就能迅速引发许多复杂的生理生化反应。这一模式能比较合理地解释许多病理现象。

三、不亲和性互作

植物的抗病性包括预存的被动抗病性和病菌侵染后激发产生的主动抗病性。在主动抗病性中有两套基因先后起作用,即抗病基因和防卫反应基因。抗病基因产物与病菌无毒基因产物有识别作用,从而诱导防卫基因表达,产生一系列防卫反应。所以抗病基因产物(抗病蛋白)是一种效应分子,本身无杀菌作用。真正起抗病作用的是通过防卫反应产生的植物在形态和生理生化上的许多改变。形态的变化包括周皮形成、侵填体及乳突的形成,细胞壁修饰(胼胝质、木质素和酚类化合物在壁上沉积)、富含羟脯氨酸糖蛋白(HRGP)和富含甘氨酸糖蛋白(GRP)的积累,生理生化的变化包括植物保卫素、蛋白酶抑制剂、PR蛋白即病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins)和能攻击病原物的水解酶(几丁质酶和葡聚糖酶)的产生等。

1. 抗病基因

分离和克隆抗病基因并对之加以利用是研究植物-病原物互作的最终目标。在遗传育种方面,通过建立添加系、易位系、缺体系品系等,已鉴定出小麦抗白粉病、水稻抗白叶枯病、玉米抗叶锈病等抗病基因所在的染色体位置,并通过DNA杂交找出了水稻抗白叶枯病、番茄抗叶斑病、马铃薯抗X病毒病等基因的特异性探针。通过转座子标签法分析了玉米抗叶锈病基因的精细结构。近年来,在转座子标签、RFLP原理基础上,又发展了TDNA tagging,RAPD,base-reversed cloning,YAC克隆及染色体步进等技术,对抗病基因进行标记和克隆。已克隆出的抗病基因有3个:豌豆抗花叶病毒的基因,编码蛋白质抑制剂,抑制病毒翻译过程中蛋白质的加工;玉米抗圆斑病菌1号小种的基因Hml,它是一种分解毒素的酶;番茄抗细菌性叶斑病的基因Pto,是一种蛋白质激酶,起接受和传递信号的作用。

2. 防卫反应基因

研究较多并已得到克隆的防卫反应基因有与植物保卫素合成有关的酶如PAL、CHS、CHI等的基因;PR蛋白的基因如几丁质酶、β-1,3-葡聚糖酶、PR-la等的基因;木质素合成有关酶的基因;HRGP和GRP的基因;乙烯及酚类物质合成酶的基因;病原物酶抑制剂的基因以及一些功能未知但与防卫反应有关的cDNA克隆。研究发现,许多防卫反应基因都是诱导表达的,且以基因家族(family)出现,不同植物中的同类基因有较高的保守性。

防卫反应基因对信号刺激的反应相当快。用激发子处理菜豆悬浮细胞2—5分钟后与

植物保卫素合成有关的酶及几丁质酶的基因就表达了。首先是mRNA量升高，导致膜板活性升高，翻译速度加快。此外，各种防卫反应基因的表达具有组织、器官及细胞类型特异性以及时间上的先后顺序。激发子处理的菜豆悬浮细胞中，最先表达的是植物保卫素合成有关酶的基因，其后是水解酶和PR蛋白基因，再后是木质素及HRGP和GRP基因等。

豌豆内果皮对根腐病菌的整个抗病性表达进程在5小时内即告完成，而且在植物保卫素合成之前真菌就受到抑制。类似的情况在其他病例中也有报道。因此，植物保卫素可能只是对病菌的再次侵染发生作用。抗病品种只抗那些对植物保卫素敏感的小种或菌系，能忍耐或分解植物保卫素的小种或菌系仍能使寄主发病。在植物基因表达的空间定位方面近年来已有很快发展。研究结果表明，一般是在侵染点及周围有限细胞内有明显防卫反应，距病斑3mm Gus活性就下降12倍。属于局部活化的反应有过敏反应、植物保卫素积累、酚类聚合物形成，有时还有几丁质酶的参与。查尔酮合成酶的活化、异黄酮类化合物积累、β-1，3-葡聚糖酶和过氧化物酶活性提高则能从侵染点向外扩散[9,10]。水解酶（几丁质酶和β-1，3-葡聚糖酶）在植物抗病中的作用，首先是作用于病原物后释放出具激发子功能的细胞壁片段。这些酶还可以分解病菌的细胞壁和阻止病菌菌丝生长物质在顶端沉积[11]。肼胝质激发子如脱乙烯几丁质显然不与蛋白受体结合，而是作用于大面积原生质膜上的磷脂端部基团或插入膜的脂相中。但是肼胝质和植物保卫素合成具有一些共同的起始反应，如Ca^{2+}吸收，外部碱化和K^{+}渗漏。用大雄疫霉（*Phytophthora megasperma*）的葡聚糖激发子处理欧芹细胞在几分钟内即发生上述反应，全过程延续仅约20分钟，而用肼胝质激发子脱乙烯几丁质或毛地黄皂甙所引起的Ca^{2+}吸收能延续较长时间。

3. 无毒基因

一般认为，无毒基因直接或间接的产物是和寄主抗病基因产物互作诱发植物防卫反应的特异性激发子。尽管许多病原物的无毒基因已克隆出来并已测序，有的还做了体外表达，但其产物的一级结构仍不能解释其与寄主的不亲和作用的机制。然而，烟草花叶病毒中编码外壳蛋白的无毒基因具特异性激发子作用，能在具相应抗病基因的烟草品种上引起过敏反应。将该基因转移到具相应抗病基因烟草的原生质体中，也能诱发过敏反应，产生组织坏死。对这一系统的深入研究将有助于对植物-病原物非亲和性互作的机制的深入了解。

许多病害中植物对病菌抗性的表型是产生过敏反应。细菌中与诱发过敏反应有关的基因有*avr*基因和*hrp*基因。*avr*基因从功能上看有两类，一类只决定小种特异性致病能力，另一类兼有诱发过敏反应的能力。*hrp*基因是与寄主致病性和非寄主植物过敏反应有关的基因。从生化角度，细菌产生的诱导过敏反应的物质有碳水化合物和蛋白质或糖蛋白。水稻白叶枯病菌诱导烟草产生过敏反应的物质是胞壁脂多糖中的多糖部分。而在梨火疫病菌中则发现细菌过敏反应基因的产物是一种蛋白质，称为harpin。番茄叶霉病菌的无毒基因*avr*9的产物是3 049道尔顿的多肽，能引发具Cf9抗病基因的番茄品种产生过敏反应。总之，虽然有关基因已克隆了不少，但对于细胞的诱导因子、植物细胞受体的本质、不亲和病菌繁殖受阻的原因以及植物细胞膜受损的机制并不完全了解。

四、亲和性互作

植物病害的症状类型与致病因子的性质有密切联系。通常认为腐烂与病菌分泌的胞壁降解酶有关；坏死与毒素有关；萎蔫可能与毒素有关，也可能与胞外多糖有关；生长畸形与激素失调有关。近10年内已鉴定了各类病原物与致病有关的基因50多个，其中除编码上述有关生化因子外，还有一些编码未知产物的基因。

1. 胞外酶基因

病原物胞外酶包括角质酶、果胶酶、纤维素酶、蛋白酶以及植物激素合成酶等。1987年，Kolattukudy 从 *Fusarium solanipisi* 中克隆了植物病原物第一个角质酶基因，其氨基酸序列与几丁质酶同源。目前已从许多植物病原真菌和细菌中克隆出不同的果胶酶和蛋白酶基因，其中以软腐欧氏杆菌研究最多，并证明了它们在致病中的功能。克隆的纤维素酶基因主要来自病原细菌，它们编码内葡聚糖酶，与致病力有相关性。植物激素合成酶基因，如根癌土壤杆菌中生长素合成酶基因 tms1 和 tms2，和细胞分裂素合成酶基因 tmr，与病原物引起寄主的畸形如肿瘤有关。此外在软腐细菌和甘蓝黑腐病菌中发现和克隆了一类控制胞外酶向细胞外分泌的基因，这类基因失活，病菌的致病酶不能到达膜外，因而也不具致病性。

2. 胞外多糖(EPS)基因和毒素基因

目前已从青枯假单胞细菌中克隆了 EPS 的基因，它能互补 EPS-突变体的致病力和 EPS 的产生能力，从而在分子水平上证明了 EPS 在致病中的作用。植物病原物毒素基因的分析和克隆研究则较迟。克隆的第一个编码毒素的基因是来自 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 的 phaseolotoxin 的基因。后来又有人研究和克隆了玉米小斑病菌毒素 HMT-toxin 基因及 HC-toxin 的基因，并发现菜豆毒素基因与寄主的相互作用关系符合激发子/抑制子-受体模式，研究发现植物病原细菌的毒素基因多数存在于质粒上并成簇排列。而病原真菌的毒素基因位于核基因组或线粒体基因组中。

3. 产物未知的基因

随机突变研究表明，植物病原物中与致病性相关的基因约是营养相关基因的10—50%，即约20—100个。它们在致病过程的不同阶段上起着不同的作用。除了上述编码已知产物的致病基因外，通过诱变并结合突变体在寄主上致病表型的分析，已克隆出许多产物没有鉴定出来的致病相关基因，其功能有待阐明。

目前在亲和性分子相互作用方面对致病相关基因的研究较多，但对各基因之间的相互关系和已经肯定的致病因子对寄主细胞上靶点的分子特征研究较少。如软腐细菌的果胶酶作用于果胶类物质分子的化学机制是很清楚的，但对果酸酶基因在植物组织中受调节的情况以及有关酶与寄主相互作用特异性的问题尚须深入探讨。

参 考 文 献

[1] Flor,H. H., Inheritance of reaction to rust in flax, J. Agric. Res., 1947, **74**: 241—262.

[2] Flor,H. H., Host-parasite interaction in flax rust-its genetics and other implications, Phytopathol., 1955, **45**: 680—685.

[3] Ellingboe,A. H., In Phytopathogenic Prokaryotes Ⅱ (Mount,M. S., Lacy,G. H., eds.). New York: Academic Press, 1982, 103 117.

[4] Halverson,L. J. and Stacey,G., Signal exchange in plant-microbe interactions, Microbiol. Revu., 1986, **50**(2): 193—225.

[5] Keen,. T., Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions, Annu. Rev. Genet., 1990, **24**: 447—463.

[6] Callow,J. A., In Genetics and Plant Pathogenesis (Day,P. R., Jellis,G. J., eds.), Blackwell Scientific Publications, 1987.

[7] Collinge,D. B. and Slusarenko,A. J., Plant gene expression in response to pathogens, Plant Molecular Biology, 1987, **9**: 389—410.

[8] Lamb,C. J., Lawton,M. A., Dron,M., Dixon,R. A., Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack, Cell, 1989, **56**: 215—224.

[9] Goodman,P. N., Kiraly,Z., Wood,K. R., The Biochemistry and Physisology of Plant Disease, Columbia University of Missouri Press, 1986.

[10] Graham T. L. and Graham,M. Y., Cellular coordination of molecular responses in plant defense, MPMI, 1991, **4**: 415—422.

[11] Darvill,A. G. and Albersheim,P., Phytoalexins and their elicitors-a defense against microbial infection in plants, Annu. Rev. Plant Physiol., 1984, **35**: 243—275.

[12] Wit,P. J. G. M., Molecular characterization of gene for gene systems in plant-fungus inreactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens, Annu. Rev. Phytophathol., 1992; **30**: 391—418.

MOLECULAR BIOLOGY OF PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS

Zhang Xuejun

Gene-for-gene concept was put forward by Flor and got great developments, being the basis for modern research on molecular biology of plant-pathogen interactions. Gene-for-gene relationship exists in many disease systems. Accordingly, several hypotheses have been supposed to explain the molecular mechanisms of the interactions, including the dimer model, the elicitor-receptor model, the elecitor/inhibitor-receptor model and ion-channel defence model. Based on these models, the involved genes in both hosts and pathogens have been identifying and the expression and regulation mechanisms of these genes have been exploring. In incompatible systems, extensive researches are focused on defense response genes and their products, for example, genes involved in phytoalexin synthesis and pathogenesis-related proteins from plants, while few success in research of

resistance genes, although many works have been done. Avirulence genes have been cloned from various pathogens, but their products not characterized and not fitted into the prevalent interaction models. In compatible systems, virulence-related genes from a vast range of pathogens ware fully identified and cloned, which are genes involved in biosynthesis of extracellular enzymes, extracellular polysaccharides, toxins and growth regulators, and the genes coding unknown products. Many many questions remain to be answered in order to understand the molecular biology of plant-pathogen interaction.

植物-病原物识别

董汉松

寄主植物-病原物相互作用是一个连续的、分阶段而发生的过程。识别作用发生在相互作用的最早阶段，能启动或引发寄主植物一系列的病理学反应；它是一种以双方间信息传递（特定分子间的引诱、刺激或特异结合）为机制的、分子和细胞水平上的专化性相互作用[18,32]。识别有多方面的生物学、生态学和病理学意义。它是植物与微生物共同进化发展到高度专化或特异阶段，由多种植物与微生物发生相互作用所表现出来的选择性和专化性；在有多种微生物存在及病原物与寄主植物相遇机会很少的情况下，也可以保证高机率和有效的相互作用[36]（本文写成于 1990 年，收入本书时作了少量补充）。

一、识别方式

从功能上说，识别方式主要是指不同的寄主-病原物相互作用体系启动寄主专化性反应的最初机制，有接触前识别、接触识别、接触后识别 3 种。识别在操纵机制上有两种形式，即分子对细胞的识别和细胞对细胞的识别[27,38]。

1. 接触前识别

这是指病原物受寄主专化性的理化刺激或引诱，向寄主方向移动（趋性）或生长（向性）的能力[50]。趋性运动和向性生长大都是非专化性的，具有识别意义的情况很少。专化性向性的例子有白腐小核菌（*Sclerotium cepivorum*）的向化性，菌核的萌发必须有寄主根分泌物的专化性刺激，萌发的芽管对寄主根分泌物或外渗物表现为加快生长的反应，这种反应不能被非寄主植物所诱导[27]。趋性具有识别意义的例子也只见于少数趋化性运动，如三叶草疫霉菌（*Phytophthora megasperma*）游动孢子[50]及柑桔根线虫（*Tylenchulus semipentrans*）[51]等对各自寄主根分泌物的趋化性运动，表现出严格的寄主专化性。

接触前识别在寄主-病原物相互作用中的意义因病原物种类或相互作用体系而不同。病原线虫的趋化性运动大多可导致线虫对寄主的侵入，但在大多数体系或对病原真菌来说，接触前识别本身还不足以导致相互作用的进一步发生，识别取决于病原物与寄主接触或其后的过程。

2. 接触识别

在寄主植物表面发生的识别作用，主要是以细胞对细胞识别的形式进行的。见于以下两种过程：病原细菌对寄主植物的吸附，真菌孢子在植物表面的吸附、芽管的生长及对气孔的侵入。

3. 接触后识别

在病原物与寄主接触不甚重要，或接触为非专化性或不提供信息内容（或刺激信号）的体系中，识别必须取决于随后的过程。接触后识别主要发生在以下过程中：病原真菌寄主专化性毒素的致病作用；病原物对寄主植物保卫素的诱导；病原物诱导性致病酶的诱导合成，都是按分子对细胞识别的形式发生的。

二、分子-细胞识别

发生在病原物的分子与寄主细胞间的识别作用，病原物的分子被称为配体(ligand)，由病原物产生后扩散到达寄主细胞，与寄主细胞表面的受体分子(receptor)发生结构互补的特异结合。配体和受体间的特异结合被称为分子识别，它在配体分子到达植物细胞表面后立即发生，并引发一系列的细胞反应[27,38]。上面提到的接触后识别，大致按这种方式发生。

1. 病原物酶的诱导合成

对以诱导性酶为主要致病手段的病原物来说，酶的诱导合成是接触后识别的一种主要类型，对引发随后的病理学反应至关重要。病菌产生的起始水平的酶对作为酶底物的植物细胞壁某种成分的作用，首先依赖于这种酶的释放和扩散，酶解作用在酶动力学上是一种严格的分子对分子的专化性作用；接触识别（例如真菌孢子萌发产生的芽管与寄主细胞接触）对病原物诱导酶基因的活化也同时发生[30]。随后的酶诱导合成与致病作用则属于分子-细胞识别的引发事件，包括酶解产物作为诱导因子对病原物的信息传递、酶的诱导合成及酶解产物对酶作用的负反馈（或抑制）调节[7,33,34]。

2. 植物保卫素的诱导

在多种植物-真菌体系中，寄主的植物保卫素是由病原真菌具扩散性的激发子(elicitor)诱导而合成的。同一体系中的激发子可以不止一种，其中有的激发子的诱导作用具有小种专化性。大豆素(glyceollin)是大豆受大豆疫霉(*Phytophthora megasperma* var. *glycinea*，简称 Pmg)侵染后合成的一种植物保卫素，它可以由 Pmg 细胞壁多糖非专化性地诱导，这种多糖的功能组分是 α-甲基 D-甘露吡喃糖苷；也可以为真菌细胞壁表面的糖蛋白专化性地诱导(Daly，1984)[18]。在体外测定中，来自 Pmg 小种 1 的糖蛋白可使非亲和的大豆品种大量合成大豆素，但对亲和品种影响很小。专化性取决于该糖蛋白分子中蔗糖、乳糖和半乳糖胺的比例，其中蔗糖的完整性显示出主要作用。Pmg 小种 1 的外蔗糖酶可以抑制亲和品种大豆素的积累，但对非亲和品种无影响。

马铃薯与晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)间的相互作用代表了另一类情况[41]。非亲和关系以寄主对非亲和小种的过敏性坏死反应(HR)为表型特征，倍半萜类植物保卫素的诱导合成是参与 HR 对病菌抵抗和抑制的主要机制，但小种专化性则取决于植物保卫素诱导合成的抑制作用。真菌诱导 HR 和植物保卫素合成的激发子为两种不饱和脂肪酸，二十碳四烯酸(AA)和二十碳五烯酸(EPA)。AA 和 EPA 只能诱导茄科植物合成植物保

卫素，而且只对双环倍半萜类植物保卫素有诱导作用。它们在真菌细胞内产生后需经真菌的内源脂氧合酶(LIXase)的作用，在4、5、8、11位碳上联结成双链才有激发子活性。双链的AA和EPA扩散到达马铃薯细胞表面，与表面受体位点结合后启动植物保卫素的合成。但AA和EPA对马铃薯植物保卫素的诱导不具小种专化性，小种专化性是由植物保卫素合成抑制子(suppressor)的作用决定的。一种得到鉴定的抑制子为以β-1，3和β-1，6糖苷键联结的17－23碳的葡聚糖，它也是由真菌产生，并处于游离状态。它的抑制作用不是通过封闭植物细胞上AA和EPA的受体位点而发生的，而是直接作用于LIXase。因此，AA和EPA的双链化成为决定小种专化性的关键反应。在亲和关系中，抑制子作用于LIXase而阻止AA和EPA的双链化，植物保卫素不能被诱导合成，导致寄主发生感病反应；在非亲和关系中，双链化的AA和EPA诱导寄主合成植物保卫素，导致HR发生。从接种到这一关键期，即分子-细胞识别开始发生的时间，仅为5小时，其中经过接触和表面生长阶段。

3. 病原真菌寄主专化性毒素的作用

已知至少有11个植物病原真菌属的18种真菌可以产生寄主专化性毒素(HST)[4,10,41]。HST作为致病因子的作用典型地代表了分子-细胞识别的特征。HST在病原真菌与寄主接触的初期产生，扩散到达植物细胞内的作用部位，与毒素受体位点结合后引发寄主的细胞学反应。这种分子-细胞识别包含了植物与真菌从基因控制到基因产物的生化表达整个过程中的相互作用[48]。

毒素的产生和寄主对毒素的接受性受基因对基因关系控制。例如，玉米小斑病菌(*Helminthosporium maydis*)小种T和小种O的毒素产生性状为近等基因控制，小种T编码T毒素(HMT)的基因Toxl为单显性遗传[47]；含T型雄性不育细胞质(cms-T)的玉米对HMT的敏感性由线粒体基因控制，敏感基因为在345bp处开放阅读框的DNA片段，它转录为mRNA后的翻译产物是一个12.967kDa的多肽[21]；而正常玉米线粒体缺少这个多肽产物，但含有编码21kDa多肽的mRNA[26]。

HST作为配体的分子结构和组成，与它们在植物上的作用部位间存在密切关系。已知的HST对植物的作用部位有3种：质膜系统、线粒体、叶绿体或某些酶[41]。由两种真菌产生的作用于cms-T玉米线粒体的HST分子主体结构均为线性，以聚乙酮醇为基本单位，含共同的作用分子，仅有链长短的差别[23,41]，而作用于质膜系统的几种HST虽由不同真菌产生，但分子主体结构均为环状(Nishimura等，1987)[41]。由链格孢(*Alternaria alternata*)的草莓致病型产生的AF毒素，与该菌日本梨致病型产生的AK毒素一样，对敏感的梨品种都有很高的专化性毒性，原因在于AF毒素与AK毒素分子主体结构都是三烯醇酸，仅在C_2位上基团不同，AK是NH，AF是OH[40]。

某种HST与它在植物细胞受体位点上受体分子间的特异结合，是这种分子-细胞识别的第一步。燕麦叶绿体对HV毒素(维多利亚素)和日本梨细胞膜对AK毒素的受体分子是含巯基的蛋白质，HV或AK毒素与这种受体蛋白质间的分子结合表现出与病原细菌-寄主植物分子识别相似的半抗原抑制效应[5]，可以为毒素的结构类似物所抑制[41]。分子识别引发的寄主细胞反应包括：氧控反应过程，直接与膜的透性改变有关；mRNA和蛋白质的非正常合成，导致质膜构象改变和结构的破坏；杀伤性蛋白质的产生或释放(如过

氧化物酶)，引起质膜的严重破坏和细胞死亡，并最后导致组织坏死[4]。

三、细胞-细胞识别

识别双方以分子识别实现细胞间特异结合，并引发一方或双方细胞学专化性反应的过程。受体分子分布在一方的细胞上，在另一方，配体分子或分布在细胞上，或以游离状态扩散出来；配体与受体间的分子识别导致细胞识别的发生[38]。而细胞识别表现为细胞水平上的二级反应，是通过分子识别对细胞生理生化功能的活化实现的，例如在根瘤菌-豆科植物相互作用体系中接触识别引发的寄主根毛细胞壁的分化和根毛的卷曲[20,38]。对于寄主植物-病原微生物相互作用体系，细胞对细胞识别的许多特性都是以细菌与植物，尤其是以根瘤菌与豆科植物间的接触识别而界定的。细胞识别以细菌与植物表面的特异结合，即专化性吸附为特征，并以双方特定分子间的分子识别为前提[6]。植物表面的分子以受体形式出现，被称为植物识别子(cognor)；细菌表面的分子以配体形式起作用，被称为细菌识别子(cognon)[5]。与 ligand 和 receptor 相比，cognon 和 cognor 更能表示分子识别的功能，在想像的几何图形中是一种"锁钥"的关系或衣服拉链的"扣合"关系。这些术语在不同文献中常没有明确的界定，有的将 cognor 与 ligand、cognon 与 receptor 视为同义，认为 cognor 代表体系中的能动部分，而 cognon 只是一个被动部分，提供被识别的位点[27,38]。但实际情况是，植物表面的 cognor 多固定在细胞壁上而接受识别。

1. 植物-真菌接触识别

病原真菌在侵染过程中，有 3 个阶段必须与寄主表面接触：孢子附着；芽管生产；芽管或侵入丝穿过气孔下室。在多数体系中，接触对相互作用的发展并不重要，接触识别的重要性只见于少数体系。

(1) 孢子吸附和芽管产生：一般认为，真菌游动孢子对寄主表面的附着必须有粘质分泌物的作用。十字花科植物根肿菌(*Plasmodiophora brassicae*)的孢子囊可产生外纤维，在孢囊孢子与植物表面间形成一个外纤维区而使孢子附着[22]，其他鞭毛菌也有类似情况[2,3]。有些真菌起孢子联结作用的物质是真菌糖蛋白，孢子吸附表现出一定的专化性。例如，甘薯黑斑病原菌(*Ceratocystis fimbriata*)与寄主的相互作用有亲和与非亲和性分化，甘薯的孢子凝集素(SA)可以凝集非亲和菌株的孢子，但对亲和菌株无作用。SA 的主要成分是聚半乳糖醛酸(果胶质)，可专化性地凝集病菌萌发前的孢子，凝集作用受 pH 和 Ca^{2+} 调控，只有在 pH 值为 6.5、有 Ca^{2+} 存在时，凝集作用才表现出专化性[18]。

芽管的定向生长和附着胞的形成可以很好地表明真菌与寄主接触识别的情况，接触识别的机制有三：营养刺激；向触性作用；特定信号物质的作用[2,27,30,50,77]。①营养刺激：有些真菌如苹果黑星菌(*Verturia inaegualis*)的孢子萌发和芽管生长对寄主表面分泌物有专化性依赖作用，分泌物中起作用的成分有几种维生素、生物碱或氨基酸。几种锈菌及立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)附着胞的形成还需要寄主提供锌离子，在无锌离子时，即使其他条件适宜也不能形成附着胞。②向触性和信号物质的作用：以植物表面结构特征为信号而诱发的真菌向触性生长，可以调节芽管的生长方向。同时，植物表面的类脂化合物担负着刺激孢子萌发和对芽管生长的控制作用，它首先刺激孢子萌发和芽管生长，到一定时

间中止芽管生长而促使附着胞形成。受这两种作用的调控，真菌可以准确地找到侵入部位。例如，菜豆单胞锈菌(*Uromyces phaseoli*)通常从气孔侵入，寄主表皮细胞角质层的脊状突起引导芽管向气孔位置生长，芽管到达气孔瓣时停止生长并开始形成附着胞；气孔分泌物和气孔瓣表面的柔软特征刺激并启动附着胞的形成[2,27,30]。

(2) 气孔对侵染的反应：锈菌和白粉菌侵入气孔所引起的寄主反应，是这类真菌在寄主表面细胞上接触识别事件的继续，也说明了植物-真菌接触识别的另外两种机制。

各种锈菌与寄主的关系都有亲和与非亲和性分化。在亲和反应中，亲和性小种可以完成侵染并与寄主建立寄生关系；在非亲和反应中，非亲和小种或非致病菌的侵染行为在某个阶段被中止。亲和与非亲和反应主要取决于真菌侵入气孔下室及以后的过程。气孔下室的囊膜化可以中止某些非病原菌的侵入行为，病原菌的行为发展也依亲和性而有不同。在通过这种囊膜侵入的过程中，非病原菌和病原菌的非亲和小种可以破坏副卫细胞，并伴有真菌一部分侵入丝或菌丝体的死亡和消失。与此同时，亲和反应中的副卫细胞和囊膜表面产生一种糖蛋白，使菌丝附着并产生夏孢子，夏孢子产生后也可与糖蛋白联结而成为夏孢子堆的集结点。在这种情况下，由糖蛋白参与作用的菌丝和孢子吸附还有助于真菌再侵染的发生[41]。

大麦对白粉菌(*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*)的抗性(非亲和关系)由 ml-oR 基因控制，感病性(亲和)由 ml-oS 基因控制。决定亲和与非亲和关系的生化反应发生在真菌通过气孔下室侵入的阶段。在亲和关系中，寄主在真菌穿过气孔下室和附着胞形成以后产生乳突；在非亲和关系中，乳突的形成发生在真菌的这两种行为之前。乳突的产生是由寄主基因控制、细胞质 Ca^{2+} 调机制参与作用的过程。在 ml-oS(亲和)品种中，Ca^{2+} 调功能微弱，乳突形成所需的代谢活动受到抑制；在 ml-oR(不亲和)品种中，Ca^{2+} 调机制或为预存性功能，或因真菌的接触而迅速增强，通过加强有关代谢活动而促使乳突形成。在导致乳突形成的代谢过程中，Ca^{2+} 的螯合最终导致 ml-oR 品种的亲和反应，其中乳突的形成也受到抑制[41]。从基因对基因关系所作的研究表明，决定亲和与非亲和关系的基因控制因病害而有不同。例如，在小麦杆锈病中，非亲和小种拥有可以克服寄主一系列抗病反应的基因[14]；而在小麦叶锈病中，寄主抗病基因的表达可以导致非亲和反应[24]。

2. 植物-细菌接触识别

它是大多数植物-细菌相互作用体系引发细胞识别反应的最初机制，是以细菌提供 cognon、植物提供 cognor 的细胞对细胞识别反应。Cognor 多以特定构型分布在植物细胞壁上，而 cognon 或由细胞表面扩散出来，或联结在细菌表面 cognon 的载体上。从分子识别到细胞识别，要经过 cognor 与 cognon 特异结合到菌体与植物表面的联结过程；作为 cognor 的物质和作为 cognon 的物质在体外测定中可以产生特异性免疫反应。董汉松(1991a，1991b)[5,6]、Lippincott 和 Lippincott(1984)[36]、Mazzucchi(1983)[38]等对这一过程已有详细阐述，以下主要就识别的生化基础和识别在相互作用发生发展中的意义作一概括。

(1) 植物识别子(cognor)：对 cognor 的作用和性质，通常用不同方法加以研究，如吸附抑制试验[8]、半抗原(hapten)抑制试验[38]、免疫学分析[20]、分子遗传学分析[17,29,37,39,43,45]。目前证明主要有 3 类 cognor。

第一类是果胶化合物(PC)。PC 作为 cognor 的作用主要发生在双子叶寄主植物-根癌土壤杆菌体系中，活性形式是非甲酯化的聚半乳糖醛酸。它在双子叶寄主植物细胞壁中的含量较在单子叶植物中高 4—5 倍；β-1,4-聚半乳糖醛酸主链上带有 β-1,2 联结的阿拉伯糖支链，可以减少聚半乳糖醛酸甲酯化的机会。这些特征被认为是双子叶植物的 PC 可以作为 cognor 起作用的预存性机制[28,37,38,42]。

第二类 cognor 是植物外源凝集素(lectin)。Lectin 是一类蛋白质或糖蛋白，结构中带有多个糖残基联结位点，具有一定专化性或很高专化性的菌体凝集活性和 hapten 抑制效应[38]。它作为 cognor 的作用，见于豆科植物-根瘤菌体系[20,35,43]和烟草等双子叶寄主植物对青枯假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum*)非亲和菌株的接触识别[42]中。对 lectin 在豆科植物-根瘤菌接触识别中起作用的方式，Dazzo(1982)[20]提出一个"桥梁结构模型"：Lectin 由它的载体联结在植物细胞壁上，与细菌表面的配体(cognon)联结后，在菌体与植物表面之间形成"桥梁"结构，使细菌吸附到寄主细胞上。

植物细菌凝集素 BAG(agglutinin)是植物表面可以作为 cognor 起作用的物质的总称，能凝集菌体，不受 hapten 的影响；或是尚未发现 hapten 的 lectin，或仅是酸性多糖(Mazzucchi,1983)[36]；它是叶斑型植物细菌性病害和其他某些病害系统中的 cognor。在与各自的角斑病菌的接触识别中，菜豆和其他豆科植物的 BAG 有盐溶性(S 型)和水溶性(W 型)两种形式，有 cognor 作用的是 W 型。马铃薯与青枯假单胞菌非亲和菌株接触识别的 BAG 以富含羟脯氨酸的糖蛋白为功能基团，可能属于尚未发现 hapten 的 lectin。大白菜与软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)接触识别的 cognor 也是 BAG，由它参与作用的分子和细胞识别表现出软腐组群的专化性[49]。

(2) 细菌识别子(cognon)：胞外多糖(EPS)、荚膜多糖(CPS)、脂多糖(LPS)是革兰氏阴性(G^-)细菌表面的 3 种多糖组分，在不同体系中可以作为吸附抑制因子起作用，它们的吸附抑制效应与对植物症状的抑制或减轻呈正相关趋势[42]。用化学诱变或插入突变、野生型菌株基因库对吸附缺陷型菌株的基因互补等方法，证明在吸附、表面多糖、致病性之间具有一致性[15,44,46]。按分子识别的扩散学说[38]，接触识别中的分子识别是由细菌 cognon 向植物扩散并与 cognor 结合实现的。这要求作为 cognon 的分子具有可扩散性，分子直径小于 3—5nm，分子量低于 17kDa。因此，有人认为上述 3 种多糖仅仅作为 congor 的载体起作用[27]。但这不能成为植物-细菌接触识别的条件或限制，因为分子识别和由它引发的细胞识别都可以在细菌与植物的接触过程中实现[6,41]。

LPS 是 G^- 细菌表面有免疫原性的主要结构组分，含脂 A、中心低聚糖(COS)、O-抗原 3 部分[5,31]。完全 LPS(含 O-抗原)是识别所需的分子形式，它的 O-抗原低聚糖组分和顺序的变化使它作为 cognon 起作用时具有专化性[15]。作为 cognon 的作用见于作物青枯病[42]、玉米萎蔫病(*Erwinia stewartii*)[13]、植物冠瘿病[42]、大白菜软腐病[6,9,49,53]和某些叶斑型病害[14]等体系。某些用作生物防治的细菌如荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)也需吸附到植物根上，并要有 LPS 参与作用[25]。LPS 在几种豆科植物-根瘤菌体系中的作用已重新得到证实[15]。在三叶草-*Rhizobium trifolii* 体系中，可发生 3 种类型的接触识别：由 LPS 参与作用的快速吸附，由 EPS 调节的第二种类型的吸附，由细菌性纤毛调节的第三种类型的吸附[38]。这说明，相互作用高度专化的细菌拥有与寄主发生有效识别的多种机制。

EPS 是 G^- 细菌表面呈半流体状态和易于洗脱的组分，组成和性质因菌而有差别[16]。它在接触识别中有两种作用：作为亲和性菌株 LPS 的掩盖物，使细菌以"逃避"识别的形式侵入植物并扩展，见于作物青枯和玉米萎蔫等病害系统；作为 cognon 起作用，发生在某些根瘤菌共生体系和某些叶斑型病害中(Peuppke，1984)[42]。

CPS 为 G^- 细菌表面较 EPS 固态性稍强的组分，是大多数根瘤菌的特征性表面成分。它的热稳定性和可扩散性，被认为符合 cognon 的要求，在离开菌体的条件下也具有引发细胞识别（如根毛卷曲）的作用[19,20]。在豌豆-*Rhizobium leguminosarum*、三叶草-*R. trifolii* 体系中明确由 CPS 参与的识别发生在相互作用的最早阶段而具有引发植物（或与病原物双方）进一步反应的能力。

图 1、图 2 分别是关于识别在相互作用中的地位和一个分子识别模型的说明，图 3—5 提供了对不同体系的有关研究例子。目前人们对与识别有关的分子遗传学作了大量研究，为这样一种假说提供了证据：寄主抗病基因与病原物无毒基因产物间的相互作用导致寄主抗病（非亲和关系），而缺少两种或其中一种产物则导致感病（亲和关系），这是基因对基因关系用于互作生物化学的一个基本假定[18]；同时也揭示了另一类基因相互作用情况：植物感病基因与病原物毒性基因间的相互作用导致亲和反应，如 HST 的作用。王金生[54]对此有深入阐述。

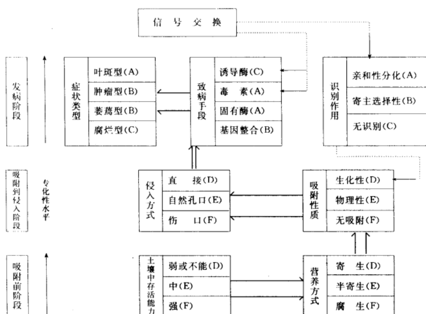


图 1 病原细菌-寄主植物相互作用阶段性和专化性的一般模式

表示相互作用发生的时间顺序;字母 A—F 表示标有相同字母的反应可发生于同一病害系统中或有一定联系;

---→所指的反应中可发生分子识别或信号交换。

Fig. 1 A general diagram on the specificity of the interactions between phytopathogenic bacteria and their host plants

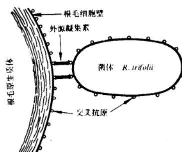
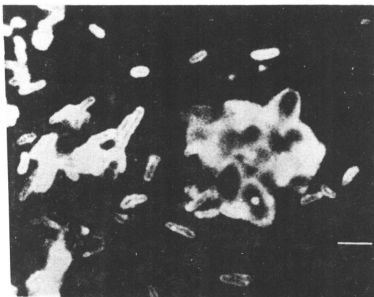


图 2 一种由 lectin 参与作用的分子识别模式(仿 Dazzo 等,1975,1984)

Fig. 2 Schematic diagram showing the cross-bridging of cross-reactive antigens of *Rhizobium trifolii* and clover root hairs with a clover lectin(based on Dazzo et al. , 1975,1984)



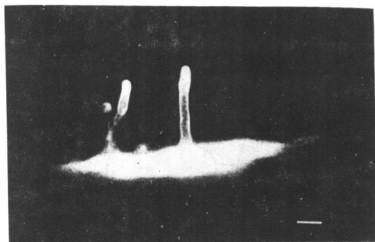


图3　对图2分子识别模式的一种检测方法

用免疫荧光技术检测三叶草根瘤菌(*Rhizobium trifolii*)和蔓生三叶草(*Trifolium repens*)根表面的抗体。

上：三叶草根瘤菌菌株403用三叶草根的抗抗体进行的间接免疫荧光处理，反应明显，标尺2μm。

下：用三叶草根瘤菌菌株2S-2的抗抗体对蔓生三叶草根和根毛进行间接免疫荧光处理，反应明显，以根毛顶端反应最为强烈，标尺45μm(照片由Dazzo提供)。

Fig. 3　Fluro-immunological tests of contact recognition between *Trifolium repens* and *Rhizobium trifolii* (The prints are provided by Frank B. Dazzo).

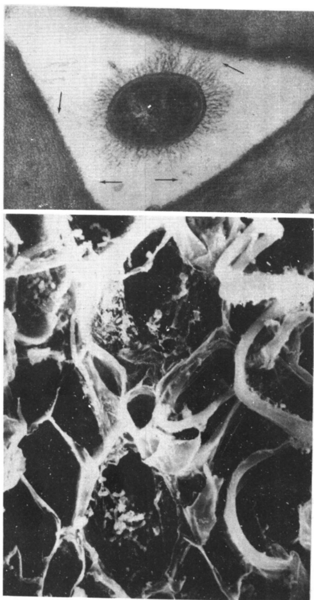
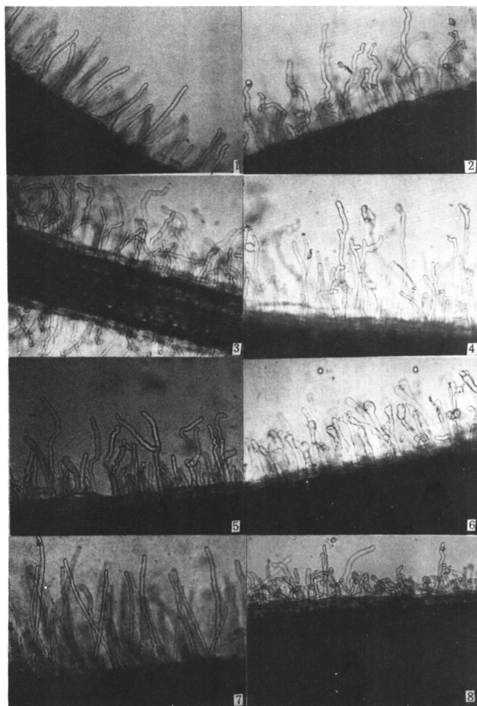


图 4　细胞识别和细胞识别后事件的例子

Fig. 4　Examples of events triggered by recognition

上：非亲和识别——*Erwinia amylovora* 在豌豆细胞间隙的情形，细菌悬液用注射渗入法(filtration)注入叶片，菌体 LPS 作为与寄主细胞壁结合的媒介起作用(照片由 Goodman 提供)。

下：亲和性识别——*E. carotovora* pv. *carotovora* 在与大白菜根表接触识别(参见文献[8,9])之后侵入寄主维管束。



1
2
3
4
5
6
7
8

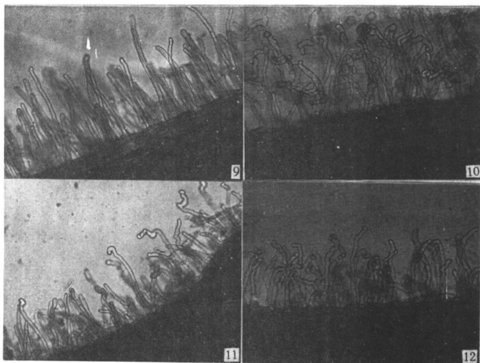


图5 研究细菌识别子表型作用的一个例子：根瘤菌-豆科寄主体系

Fig. 5 An example of testing recognition factors

1. 不接种的寄主(三叶草)根毛生长正常。
2. 用 *Rhizobium trifolii* 菌株 CC10 的 S 型菌体(生长慢、菌落小、致瘤)接种后根毛卷曲。
3. 不接种的寄主幼根在含 50μg/ml 菌体 EPS 的培养液中生长，根毛变形。
4. 寄主幼根在 50μg/ml 的 NA-34 S 型菌体 EPS 的培养液中生长，表现典型的根毛变形。
5. 不接种的寄主幼根在 100μg/ml NA-34 菌体的 EPS 中生长，根毛严重变形。
6. 在与上相同(幼根生长于 EPS 中)的条件下接种病菌，表现典型的根毛变形。
7. 幼根用菌株 NA-34 的 L 型菌体(生长快、菌落大、不致瘤)接种，根毛呈"波浪状"生长，变形不明显。
8. 幼根用菌株 NA-34 的 S 型菌体接种，根毛呈典型卷曲。
9. 不接种的幼根用菌株 NA-34 的 L 型菌体的 EPS(50μg/ml)处理，根毛不变形。
10. 上述处理后用 NA-34 的 S 型菌体接种，根毛严重变形。
11. 用 50μg/ml S 型菌体的 EPS 处理幼根后，接种 L 型菌体。
12. 用 100μg/ml S 型菌体的 EPS 处理幼根后，接种 L 型菌体。

(以上照片均由 Dazzo 提供)

参 考 文 献

[1] 王金生、董汉松、方中达,植物病理学报,1986,**16**:185—191。

[2] 吴文希,植物病理学,茂昌图书有限公司,台北,1984,197—276。

[3] 张广民、王智发、张修国、时呈奎,中国烟草,1992,**3**:6—13。

[4] 章元寿,真菌学报,1991,**10**:169—181。

[5] 董汉松,植物生理学通讯,1991,**27**:391—396。

[6] 董汉松,烟台师范学院学报(自然科学版),1991,**7**(2):62—67。

[7] 董汉松、王金生、方中达,植物抗性生理研究(赵可夫主编),山东科学技术出版社,济南,1992,201—205。

[8] 董汉松、王金生、方中达,微生物学报,1993,**33**:144—150。

[9] 董汉松、王金生、方中达,山东农业大学学报,1990,**21**(3):8—14。

[10] Agnihotri,V.P.,Shngh,N.,Chaube,H.S.,Dwivedi, T.S.,Perspectives in Phytopathology,TTPP,New Delhi,1989,93—112。

[11] Allen,E.A.,Hazen,B.E.,Hoch, H.C.,et al., Phytopathol., 1991,**81**:323—331.

[12] Ashby,A.M.,Watson,M.D.,Loake, G.J.,Shaw, C.H., J. Bacteriol., 1988,**170**:1481—1487.

[13] Bradshaw-Rouse,J.J.,Whatley,M.H.,Coplin,D.L.,et al.,Appl. Environ. Microbiol.,1981,**42**:344—350.

[14] Carde,S.,Bender,C.L.,Appl. Environ. Microbiol. 1991,**57**:2435—2439.

[15] Carrion,M.,Bhat,U.R.,Reuhs,B.,Carlson, R.W., J. Bacteriol.,1990,**172**:1725—1731.

[16] Copiin,D.L.,Cook,D.,Molec. Plant-Mirobe Interac.,1990,**3**:271—279.

[17] Crews,J.L.R.,Colby,S.,Matthysse,A.G.,J. Bacteriol.,1990,**172**:6182—6188.

[18] Daly,J.M.,Annu. Rev. Phytopathol.,1984,**22**:273—307.

[19] Dazzo,F.B.,Appl. Microbiol.,1975,**30**:1017—1033.

[20] Dazzo,F.B.,Appl. Environ. Microbiol.,1982,**44**:478—490.

[21] Dewey,R.E.,Levings,C.S.,Timothy,D.H.,Cell,1986,**44**:439—449.

[22] Dunkje,L.D.,In:Kosuge, T. and Nester, E.W.(eds.),Plant-Microbe Interactions, Molecular and Genetic Perspectives,Academic Press,New York,London,1984,29—63.

[23] Durbin,R.D.,Toxins in Plant Disease. Academic Press, New York,1981,221—235.

[24] Drijepondt,S.C.,Pretorius,Z.A.,Plant Dis.,1991,**75**:526—528.

[25] De Weger,L.A.,Van Der Vlugt,C.,Wijfies,A.M.,Bakker, P.,Schippers, B., Lugtenberg, B.,J. Bacteriol.,1987,**169**:2769—2773.

[26] Forde,G.G., Leaver,C.J., Proc. Natl. Acd. Sci. USA,1980,**77**:418—422.

[27] Goodman,R.N.,Kiraly,Z.,Wood,K.R.,The Biochemistry and Physiology of Plant Disease, University of Missouri Press,Columbia,1986,1—45;105—149;318—346.

[28] Gelvin,S.B.,Plant Physiol., 1990,**92**:281—185.

[29] Hawes,M.C.,Smith, L.Y.,J. Bacteriol.,1990,**171**:5668—5671.

[30] Jones,G.G.,Plant Pathology,Principles and Practice,Open University Press,Milton Keynes,1987,33—43.

[31] Kaneda,T.,Microbiol. Rev.,1991,**55**:288—302.

[32] Kleln,D.A.,salzwedel,J.L.,Dazzo,F.B., In:Nakas. J.P., Hagedorn, C.(eds.),Biotechnology of Plant-Microbe Interactions,McGraw-Hill Publshing Company,New York,1990,189—225.

[33] Kolattukudy,P.E.,Podila,G.K.,Roberts,E.,Dickman, M.D.,In:Staskawiez,B.,Ahlquist,P.,Yoder, O.(eds.),Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions,Alan R. Liss. Inc.,New York,1989,87—102.

[34] Kotoujansky,A.,Annu. Rev. Phytopathol.,1987,**25**:405—430.

[35] Ligon,J.M.,In:Nakas,J.O.,Hagedorn,C.(eds.),Biotechnology of Plant-Microbe Interactions, McGraw-Hill Publishing Company,New York,1990,145—187.

[36] Lippinncott,J.A.,Lippicott,B.B.,In:Kosuge, T., Nester, E.W.(eds.),Plant-Microbe Interactions,Molecu-

lar and Genetic Perspectives, MPS, New York, 1984, 195—214.
[37] Matthysse, A. G. , CRC Critical Rev. in Microbiol. , 1986, **13**:281—307.
[38] Mazzucchi, M. , In:Callow, J. A. (ed.), Biochemical Plant Pathology, John Wiley & Sons, Chichester, New York, 1983, 299—324.
[39] Metts, J. , West, J. , Doares, S. H. , Matthysse, A. G. , J. Bacteriol. , 1991, **173**:1080—1087.
[40] Nakatsuta, S. , Namiki, F. , Okamoto, H. , Katou K, Yamamoto, M. , Nishimura, S. , Goto, T. , Kohmoto, K. , O-tomi, H. , Novacky, A. , Annu. , Phytopathol. Soc. Jpn. , 1986, **52**:610—619.
[41] Nishimura, S. , Vance, C. P. , Doke, N. , Molecular Determinants of Plant Diseases, Jpn. Sci. Soc. Press, Tokyo; Springer-Verlag, Berlin, 1987, 29—58;97—146;203—222;235—252.
[42] Peupke, S. G. , In:Kosuge, T. , Nester, E. W. (eds.), Plant-Microbe Interactions, Molecular and Genetic Perspectives, MPC, New York, 1984, 215—261.
[43] Rinaudo, G. , Orenga, S. , Fernandez, M. P. , Meugnier, H. , Bardin, R, Intern. J. Syst. Bacteriol. , 1991, **41**:114—120.
[44] Robinette, D. , Matthysse, A. G. , J. Bacteriol. , 1990, **172**:5742—5749.
[45] Shaw, C. H. , Loake, G. J. , Brown, A. P. , Garrett, C. S. , Deakin, W. , Alton, G. , Hall, M. , Jones, S. A. , O'Leary, M. , Primavesi, L. , J. Gener. Microbiol. , 1991, **137**:1939—1953.
[46] Sidhu, S. S. , Brewin, N. J. , Kannenberg, E. L. , J. Bacteriol. , 1990, **172**:1804—1813.
[47] Tegmeier, K. , Dely, J. M. , Yoder, O. C. , Phytopathol. , 1982, **72**:1492—1295.
[48] Tsuge, T. , Kobayashi, H. , Nishimura, S. , In:Yoder, O. C. , Nishimura, S. (eds.), Host-Specific Toxins, Tottori Univ. Press, 1989, 153—170.
[49] Wang, J. S. , Dong, H. S. , Fang, C. T. , Abst. of Papers and Posters, 7th Intern. Cof. on Plant Path. Bac. , Budapest-Hungary, 1989, 205.
[50] Wynn, W. K. , Ann. Rev. Phytopathol. , 1981, **19**:237—255.
[51] Zuckerman, B. M. , Jansson, H. -B. , Ann. Rnnu. Rev. Phytopathol. , 1994, **22**:95—113.
[52] Dong, H. S. , Liu, A. X. , In:Li Debao(ed.), Plant Pathology and Biotechnology, Shanghai Sci. and Techn. Pub. , 1994, 53—71.
[53] 董汉松，山东农业大学学报，1994，**25**:367—373。
[54] 王金生，农业生物技术进展与展望(贾士荣主编)，中国科学技术大学出版社，合肥，1993，56—64。

PLANT-PATHOGEN RECOGNITION

Dong Hansong

For plant-microbe interactions, recognition is originally defined to be a specific event which is able to function as a trigger of initiation and development of the interactions. It has been rendered a intensive significance under the background of plant-microbe coevolution, where it is taken as an outcome of long period of plant-microbe interactions. In a given environment, recognition is a selectivity and specificity creaming the interactions of a great deal of plant species or their population with a great deal of microbe species and population , which enable pathogens to interact successfully with their hosts even at very low meeting frequency.

Summary for definition of recognition types:

Plant-pathogen recognitions can be divided into different categories based on differ-

ent standpoints. The compatible and incompatible recognition implies the differentiation in both the virulence or host(race or cultivar) specificity of pathogens and pathological functions or results of the recognition. In the case of incompatible recognition, avirulent strains or races of pathogens are recognized by plant hosts, and charaterized phenotypes like hypersensitive reactions(HR)of plants form, during which the avirulent strains or races are usually immobilized and encapsulated while the virulent ones take their advantages for successful infection. In the compatible recognition, pathogens show no differentiation of virulence and avirulence; recognition occurs between the hosts and infectious strains of pathogens and provides a prerequisite condition for successful infection of the pathogens . *Rhizobium* spp. , *Bradyrhizobium* spp. , *Agribacterium tumefaciens* and *Erwinia carotovora* pvs. are the typical bacteria benefiting from recognition for success in infection (Dong and Liu, 1994).

If the stage when the recognition takes place is considered, there are three types of recognitions, i. e. pre-contact, contact and post-contact recognitions. They indicate that the critical step for initiating plant-pathogen interactions is sequently by the coming process only if the former is unable to trigger the interactions. Specific tropisms of pathogenic fungi and nematodes to their host surfaces are the good explanation for the pre-contact recognition, while the excellent one is the chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens*-dicotyls interactions, where the bacterial chemotaxis induced by phenolic compounds from the host roots brings about attachment and *vir* gene activation of the pathogen, which is genetically pTi encoded and acts at different concentrations of the phenolic compounds as inducer following a two-component regulatory mechanism, initiating the T-DNA transfer to the plant (Dong, 1994; Dong and Liu, 1994). The second type, contact recognition, will be discussed as a main topic in this paper. And the third one, post-contact recognition, can be representatively expressed by the interactions of host specific toxins(HSTs)with plant hosts of pathogenic fungi.

The third category is to distinguish molecular and cellular recognition. The molecular recognition indicates specific and complementary binding between ligand molecules of pathogens and receptor molecules of plants, which will be able to, as prerequisits, or must not, lead the cellular recognition to take place, which is indeed a responsive sequence of the molecular recognition. Correspondingly, the events from molecular to cellular recognition are accomplished in two forms: molecule-to-cell and cell-to-cell recognitions.

Summary of molecule-to-cell recognition:

Molecule-to-cell recognition occurs between the ligand of pathogens and cells of plants. The ligand is usually diffusible and can move to contact the plant cells where the receptor is usually bound on the cell walls or cytoplasmic elements of plants. Specific and structurally complementary linkage of the ligand with its receptor composes of molecular recognition which is achieved immediately after the ligand molecule reach to plant cells,

and induces sequential events of the interactions. The post-contact recognition usually obeys such molecule-to-cell manner, and can be well known in three processes as follows.

The first one is induced synthesis of some of cell wall degrading enzymes (CWDEs) of pathogens. The inducible CWDEs are suggested to synthesize and act at a negative feedback regulatory mechanism, in which the oligomers or monomers from plant cell wall polymers are produced by activaties of the CWDEs at a basic level and take roles as inducers of further formation of the enzymes, and their accumulations because of the activation of induced enzymes turn to inhibit the enzymatic function of CWDEs. The molecular recognition is involved between the enzymes as ligand and plant cell wall polymers as enzymatic materials, and also between the produced oligomers or monomers by the basic level CWDEs and elicitation of the enzyme synthesis which in advance requires activation of the enzyme genes. Such gene activity likely needs secondary signals elicited by and connected with stimulus of the oligomers or monomers as the inducers.

The second process is elicitation of phytoalexins. The well established models elicitor-receptor and elicitor/suppressor-receptor interactions are typically followed in soybean-*Phytophthora megasperma* var. *glycinea* and potato-*P. infestans* interactions (Dong et al. ; Qin and Peng, this part). This is a typical sample of incompatible recognition.

Lastly, as representative of compatible recognition, functions of HSTs involve a series of specific interactions of the toxin producing fungi with their plant hosts, from genetic control which obeys the gene-for-gene relation in three kinds of expressions, through the molecular recognition between the toxin as ligand and given molecule on plant cells as receptor, and resulting in the sequence of plant pathological responses leading to formation of characterized symptoms of the plants (Dong and Lu, this book).

Summary of the cell-to-cell recognition:

Cell-to-cell recognition indicates the process in which the molecular recognition brings about the cellular recognition particularly expressed by cell to cell binding between plants and their pathogens. The cell to cell binding frequently implies adsorption or attachment of pathogens to plant surfaces, and is a typical form of contact recognition.

In plant-bacterial interactions, the molecular recognition as a precursor of cellular recognition (specific bacterial adsorption) is defined as the specific binding between cognor of plants and cognon of bacteria. In different papers, the terms are often divergent and some confusable. A "adhesin" may be either phyto- or bacterio-generating; it acts either specializedly or generally, and has no implication for passivity or activity by the interacting partners. The terms "ligand" and "receptor" implicate more specificity; the former is special for microbes and later for plants; they are approximately equal to "cognon" and "cognor", but seem unsymmetrical; on the other hand, they are widely rendered significance and frequently used in different types of pathogens and different cate-

gories of plant-pathogen interactions. In our opinion, the cognon and cognor are more pertinent for plant-bacterial interactions, and they indicate a "buttoning up each other" relation, i. e. they are implicated more than the structural complementarity.

The cognors have been proved to be lectin, pectic compounds, and bacterial agglutinin (BAG), and the cognons be lipopolysaccharides (LPSs), extracellular polysaccharides (EPSs), and capsular saccharides (CPSs) which are very similar chemically to EPS, in different interaction systems. The principle situation of gene encoding and gene regulation for bacterial cognons is that the gene members cluster in bacterial chromosome or plasmid and link with genes encoding motion (*mot*), chemotaxis (*che*), and even flagellum pattern (*fla*), and that these different species of genes condition different steps for bacterial adsorption which includes molecular and cellular recognition.

In plant-fungal interactions, contact recognition can take place at two stages of infection by pathogens. During prepenetration, attachment of fungal spores to plant surfaces may involve highly specific and biochemical interctions of the two partners. More representative interactions exist during the directed growth of germ tubes to find the invasion sites on plant epiderms; this is conditioned by specific or/and nonspecific tropic mechanisms. In the second stage, the penetration into plant stomata by direct invading fungi such as rusts and powdery mildews, incompatible responeses of plants can be mobilized by the fungal contact to restrict further behaviours of the infection.

The perspectives

It is well-known that plant-pathogen interactions be very complicated and the involved recognition be different dependently on pathosystems. Besides the HST-receptor and elicitor-receptor recognitions which have been understood in gene-for-gene concept, at least two processes remain to be clear. First, it is hypothesized that plant resistance gene controls the formation of certain molecule which recognizes the ligand of pathogens for the incompatible interactions, but no one of such receptor molecules has been obtained, in addition to that no colones of such resistance genes of plants have been obtained yet before 1990. Secondly, secondary signals must be involved after, or elicited by, the contact recognition mediated biochemically by cognor-cognon binding in plant-bacterial interactions; if not, it is difficult to image the connection of molecular recognition with cellular recognition events such as root hair curling in rhizobia-legume and formation of encapsulation structures from the cell walls in incompatible bacteria-plant systems (Dong, 1991, 1994).

植物对真菌毒素专化性反应的细胞和分子生物学

董汉松　卢培秀

自 40 年前发现维多利亚素(victorin)以来，现已明确至少有 11 个植物病原真菌属的 19 种真菌可以产生寄主专化性毒素(HST)[26,37,41,72,77]。HST 被证明是植物病害发生的决定因子[21,41]，其基本含义是：它们由某种真菌的特定致病型或菌株产生，对寄主植物的某些品种具有专化性致病作用。在表现型上，寄主不同品种对 HST 的反应与它们对病菌侵染的反应相一致；这是由 HST 与寄主细胞间的专化性相互作用决定的。HST 首先在敏感寄主细胞的特定部位发生作用，引发一系列的细胞学和生理生化学反应，最终导致症状的产生。近 10 年来，人们试图从 HST 的分子结构与寄主互作的细胞和分子遗传学反应等方面来了解其专化性作用的机制，并从基因对基因关系出发建立 HST 作为真菌识别因子的作用模型(本文写成于 1991 年，收入本书时作了少量补充)。

1. 毒素对植物细胞的作用部位

HST 对寄主植物细胞特定部位的最初作用，是它们引发植物细胞学反应的第一步。依 HST 种类的不同，最初作用部位主要有质膜系统、线粒体和叶绿体 3 种。

(1) 质膜系统：至少有 5 种 HST 已得到较多的研究。AM 毒素由苹果链格孢(*Alternaria madi*)产生，有 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ 3 种结构类似物，以 AM-Ⅰ为主成分，专化性地作用于苹果感病品种[55]。AK 毒素由梨链格孢(*A. kikuchiana*)产生，有 Ⅰ、Ⅱ 两种结构状态，AK-Ⅰ是毒性成分，引起的细胞死亡和叶脉坏死有严格的寄主专化性[63]。AF 毒素由草莓链格孢(*A. fasciculata*)产生，在 3 种异构体中，AF-Ⅰ和 AF-Ⅱ分别专化性地引起感病草莓和日本梨品种的组织坏死[60]。ACT 毒素由柑链格孢(*A. citri*)产生，有 A、B 两种成分，ACT-A 是柑感病品种的专化性毒素[40]。HS 毒素由甘蔗长蠕孢(*Helminthosporium sacchari*)产生，在 A、B、C 3 种异构体中，HS-C 是主成分，引起感病品种组织坏死[58]。这 5 种毒素对质膜的作用有 4 个共同特征：①各种 HST 的作用具有高效性和快速性，毒素使用量通常为纳克级或 1mg/ml 以下[45,54]；以电解质(主要是 K^+)渗漏为标志的质膜损伤在毒素处理(植株、组织或离体原生质体)后迅速发生[45,55]；②可见(电镜观察)的质膜损伤，包括质膜卷缩[45]、假质壁分离[54]、旁壁体形成[45]等，随毒素处理时间延长而加重，最终导致组织坏死[40,55,58,63]；③细胞壁和细胞器在细胞死亡和组织坏死前不受损伤或损伤轻微[45,53,54,62]；④质膜损伤反应仅发生在对毒素敏感(感病)的品种上[45,54,62]。

(2) 线粒体：由玉米长蠕孢(*H. maydis*)T 小种产生的 HMT 毒素[36]和由玉米叶点霉(*Phyllosticta maydis*)产生的 PM 毒素[6]均有毒性相同的 A、B、C、D 4 种组分，由柑链格孢(*Alternaria citri*)产生的 ACR 毒素有同毒性的 Ⅰ、Ⅱ 两种异构体[17]，它们均对含 T 型雄性不育细胞质(cms-T)的玉米品种发生专化性致病作用。柑链格孢柠檬致病型产生的 ACR 毒素对感病柠檬品种[60]、烟草赤星病菌(*A. alternata*)产生的 AT 毒素对感病的白

肋烟[39]，可专化性地导致组织坏死症状的产生。这 5 种毒素均可在纳克或微克级浓度下引发线粒体结构和功能的变化。受 ACR(1μg/ml)处理的糙皮柠檬感病品种的叶组织在 1 小时内断粒体嵴膨胀、数目减少、囊膜化功能减弱[43]；在受 AT 毒素处理的感病烟草叶细胞中还发生线粒体嵴的断裂[39]。抗病品种均无上述变化[43]。感病寄主的离体线粒体受 ACR(1μg/ml)处理后，在 2.5mmol/L2-脱氧葡萄糖存在时失去收缩能力，而来自抗病品种的线粒体在同样条件下保持这种能力[44]。cms-T 玉米线粒体对 HMT 毒素也有类似反应[56]。说明对毒素敏感的线粒体呼吸作用的第 3 和第 4 阶段受到毒素的影响。在 ACR 处理的敏感线粒体中，当外加 NADP 作为呼吸基质时，毒素可刺激线粒体对氧的吸收，与典型解偶联剂 2,4-二硝基酚的作用相同；而苹果酸的氧化完全受抑；来自抗病品种的线粒体均无此反应[43]。HMT 毒素对 cms-T 玉米线粒体的作用与上十分相似，仅有的差别是，在 cms-T 线粒体中当苹果酸的氧化完全受抑时，NADP 的氧化仍与对 ADP 的利用相偶联[64]。毒素作用引起的呼吸作用受抑导致能量不足，由此减弱线粒体膜及基质中某些蛋白质的合成能力[31]。对 HST 在线粒体上的作用方式，有研究表明毒素对线粒体膜的表面结合仅是作用的第一步，线粒体结构和功能的上述变化需要 HST 分子嵌入膜内。对 PM 和 ACR 敏感和抗(毒素)的线粒体联结的毒素分子的量完全相同，但前者发生上述结构和生理变化以及膜构象的改变，而后者不发生这些变化[21]。

(3) 叶绿体和某些酶：有些 HST 既不引起质膜损伤反应，也不引起线粒体的结构和功能变化，它们的作用部位是细胞的其他部分。由维多利亚长蠕孢(*V. victoriae*)产生的 HV 毒素(又称维多利亚素)[76]对燕麦感病品种的 CO_2 暗固定和乙醛酸代谢有专化性抑制作用[25]，但对它作用于叶绿体所引起的结构和生理反应还不清楚。由番茄链格孢(*A. alternata*)产生的 AL 毒素最终引起感病品种的组织坏死，它可直接抑制寄主细胞中天冬氨酸转羟酶(ACTase)的活性[22]。有的 HST 作用部位不止一处，如 AAL 除作用于线粒体外，也可直接抑制细胞内的 ACTase 活性[17]；AM 在非绿色组织中以质膜为最初作用部位，在绿色组织中还有第二个作用部位，即叶绿体[42]。

2. 由 HST 识别引发的植物细胞生理生化反应

毒素与植物间的相互关系涉及分类上各不相同的真菌和植物种类[2,6,7]，但专化性相互作用多限于链格孢与几种双子叶植物和长蠕孢与少数禾本科植物之间。这种专化性取决于 HST 作为识别因子的分子-细胞识别的发生及其引发的一系列反应。HST 参与的分子-细胞识别[34]发生的大致过程是：HST 由真菌产生后扩散到达植物细胞上的作用部位，与其上 HST 的受体分子发生特异性结合，即所谓分子识别[10,34]；这种分子识别引发植物进一步的细胞反应，并最终导致寄主发病。

(1) 分子-细胞识别特征：HST 的受体分子因真菌、植物和 HST 种类的不同而异[35]。燕麦叶绿体对 HV 毒素和日本梨细胞膜对 AK 毒素的受体分子被证明是含巯基的蛋白质，溴乙酸等巯基烷化剂可使受体分子失活而失去联结毒素分子的能力[32,41]。各类 HST 无毒性的异构体或结构类似物[47,53,60]、HST 结构组成中的某种分子[43,51]及结构类似的其他分子[20,29]，均可抑制 HST 对植物细胞质膜系统或细胞器(最初作用部位)的结构和功能的破坏作用，这种抑制作用是由抑制因子与它们所抑制的 HST 之间的位点结合竞争实

现的[20,21,41]。在自然发病情况下，HST 作为发病的起始因子迅速完成识别过程[14,16,61]，然后以抑制寄主诱导抗性的表达[12,13]或刺激感病性[77]的方式引发一系列细胞反应。

（2）识别引发的细胞反应：关于这种细胞反应的情况，已由对作用于细胞质膜系统的 AK 的研究提出了比较全面的结果。从位点结合到症状产生大致经过 3 个阶段。①氧控过程：植物组织或原生质体接受毒素处理后氧的状况直接与膜透性的改变和离子渗漏的发生有关[45,53,55]。厌氧条件可抑制 AK 毒素引起的敏感梨细胞的质膜损伤反应，而 N_2 可诱导玉米细胞质膜对 HC 毒素的敏感性[41]。②mRNA 和蛋白质的非正常合成：如旋转黑团孢（*Periconia circinata*）产生的 PC 毒素专化性地作用于高粱感病品种[6]，毒素可诱导寄主感病基因的交替表达而合成一种 16kDa 的蛋白质；该蛋白质有 4 种亚单位，抗感品种受毒素处理后有选择地合成某种亚单位而表现对毒素的抗或感[76]。在梨细胞对 AK 毒素的反应中也有 mRNA 和蛋白质非正常合成的表现。细胞接受毒素处理的最初阶段 L-赖氨酸向蛋白质的结合受到抑制，但在 4—5 小时后逐渐增强[36]。这些蛋白质被认为是质膜损伤或修饰的主要因子[41]，它们的非正常合成可受放线菌酮等蛋白质合成抑制剂（PSI）抑制，PSI 的抑制作用可持续到细胞死亡发生（对照）时，其抑制效应主要表现为减轻或减少细胞破坏的程度或死亡数目，而对质膜透性的影响很小[36,51]。因此，这类蛋白质被认为在质膜修饰和杀伤之间起承接作用[41]。③杀伤性蛋白质的产生：引起膜结构的严重破坏（卷缩、破裂等）和细胞死亡[45]。在梨细胞对 AK 毒素的反应中，杀伤性蛋白质与铜或铁螯合，很可能是过氧化物酶[41]。由杀伤性蛋白质造成的质膜损伤和细胞死亡最终导致组织坏死[54]。

图 1 是 Kohmoto 等[41]提出的一个模型，它主要是根据毒素对细胞的生化影响及其化学抑制效应建立的，对每个过程并不完全清楚。另外，它仅反映了毒素作用的一类情况。例如，AAL 和 AL 毒素可直接作用于植物细胞内的 ACTase[17,22]。ACTase 是由抑制子尿苷一磷酸（UMP）负反馈调节的一种变构酶，在精氨酸和吡啶合成中起关键作用。从对毒素敏感和不敏感（抗病）的寄主品种中提纯的 ACTase 具有完全相同的物理和酶学特性；酶动力学分析表明，在敏感寄主细胞中，毒素可作为 UMP 的增效剂起作用，使 ACTase 完全失去活性[22]。在 ALL 毒素作用过程中，寄主在组织坏死前并不发生质膜和细胞器的损伤反应[17]，说明毒素可直接进入细胞发生作用。但毒素对抗病品种无影响这一现象[22]说明它们在作用于 ACTase 之前有某种因子控制作用的专化性，对此还不清楚。又例如，HMT 毒素还可刺激寄主植物苯丙氨酸解氨酶（PAL）的活性[1]，也说明了毒素作用的多效性[21]。

3. 分子和分子遗传学基础

（1）HST 分子结构与专化性毒性的关系：研究表明，HST 的毒性与它们的分子结构有密切关系。HC（Ⅰ）毒素环状肽主体结构（图 2）中的环氧基为毒性所必需，当它被分解为二醇类时毒素即失去活性[65]。HS(O)毒素在倍半萜环的 2 位和 13 位上带半乳糖呋喃糖苷支链[20]，毒性决定于支链 C_{12} 位上半乳糖亚甲基基团的数目[29]；毒素由产生菌的半乳糖苷酶分解去掉 1—3 个半乳糖后失去活性[52]。AM 毒素中 R 基的不同[16]，HC 毒素肽环中丙（Ala）、脯（Pro）氨酸和环氧癸酸（Aoe）相互排列的不同[20]（图 2），均对毒素活性有决定作用。Daly[21]认为，毒素分子结构的微小变化对毒性的决定作用表明真菌产毒基因的

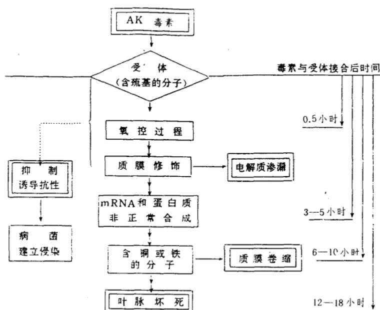


图 1 AK 毒素对敏感梨品种作用机制模式[41]

Fig. 1 A model of toxin-receptor recognition and its leading responses[6]

表达受严格控制，或毒素的产生是由单基因或少数基因编码的。HC 毒素由炭色长蠕孢（*H. carbonum*）产生，对含 Hm 基因的玉米品种有专化性致病作用[56]。用 *H. carbonum* 有性阶段 4 个种的产毒素（Tox^+）和不产毒素（Tox^-）菌株进行杂交，后代 Tox^+ 与 Tox^- 的发生比例为 1 : 1[78]。

人们进而注意到 HST 结构与它们在植物细胞上作用部位之间的关系。作用于 cms-T 玉米线粒体的 3 种毒素（HMT、PM、AAL）分子主体结构均为线性链，其中 HMT 和 PM 的组成单位都是聚乙酮醇，仅有链长短的差别和 OH 基团的不同（图 3）[24,46]；作用于糙皮柠檬线粒体的 ACR 毒素与 HMT 毒素有共同的作用分子[23]。而作用于质膜系统的几种 HST（HC、AM、HS 等）分子主体结构均为环状（图 2）。AF 和 AK 毒素虽分别由草莓链格孢和梨链格孢产生，但均可专化性地作用于敏感梨品种[60,63]。AF 与 AK 毒素主体结构均为三烯醇酸[21,41]，仅在 C_2 位上基团不同，AF 是 OH，AK 是 NH[59]。

（2）分子遗传学基础：与对其他病理学现象的研究一样，人们最终试图从基因对基因关系[71]上了解植物对 HST 专化性反应的机制。*H. maydis* 小种 T 和 O 的产毒素性状由近等基因控制[67]，小种 T 编码 HMT 毒素的基因 Toxl 为单显性遗传[50]。cms-T 玉米对作用于线粒体的 HST 反应也相应地表现出基因控制的相似性，含 cms-T 的玉米不同同核体对这类毒素反应相似[9]。cms-T 玉米线粒体和正常玉米线粒体形态毫无差别，但前者含

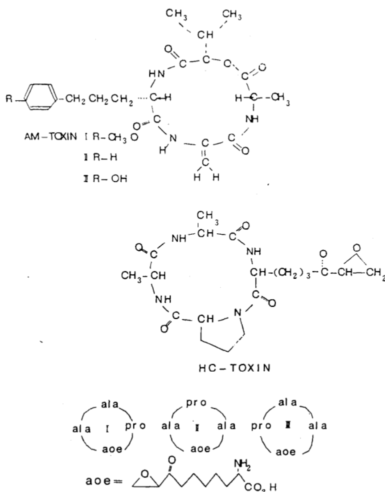


图 2　作用于寄主细胞质膜系统的两种毒素的结构

上：AM 毒素，Ⅰ($R=CH_3O$)是主成分[16]；中：HC 毒素[19]；

下：HC 毒素分子肽环中氨基酸与环氧癸酸可能的排列方式，Ⅲ是真实排列情况[20]。

Fig. 2　Structures of two toxins primarily acting at cytoplasm membranes

有一个特定的 DNA 片段，它在 345bp 处开放阅读框，转译为一段特定的 mRNA；这段 mRNA 的翻译产物是一种 13(12.967)kDa 的多肽[27]。抗毒素的正常玉米线粒体不含 13kDa 多肽和编码它的 DNA 和 mRNA，而含有编码 21kDa 多肽的另一段 mRNA，它是为cms-T 玉米线粒体所缺少的[30]。分子杂交表明，编码 13kDa 多肽的 mRNA 在 3 端可与线粒体中的一个 26S 的 rRNA 基因编码区发生重组[27]。能合成这种 13kDa 多肽的大肠杆

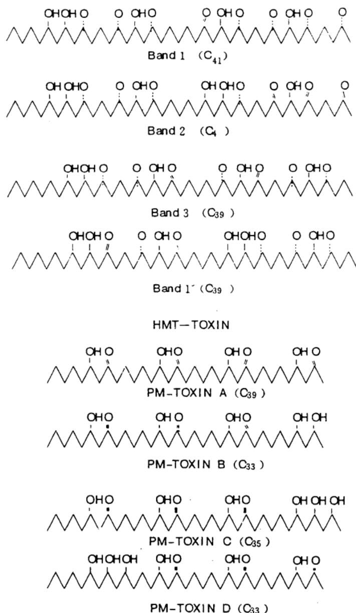


图 3 HMT 毒素[46]与 PM 毒素[24]的化学组成

Fig. 3 Chemical components of HMT[46] and PM[24] toxins

菌(*Escherichia coli*)转基因菌株(13kDa-mRNA$^+$)对 HMT 毒素敏感,这种敏感性可由 cms-T 线粒体诱导而表达[28]。

第二组结果来自对链格孢菌毒素与植物反应的研究。由 mRNA 检测、向 cDNA 的反转录和在 E. coli 的 pBR322 质粒中克隆及竞争杂交测定,表明毒素合成是由真菌特定 RNA(Poly A$^+$)控制的[70]。产毒素菌株拥有 90%以上的 DNA 同源片段[49];Tox$^-$菌株可接受(Poly A$^+$)RNA 的 rDNA 和 cDNA 片段,转基因菌株获得产毒素能力[69,70]。所用的转化载体为含 *E. coli* pBR322 质粒(带上述 cDNA)及 hph 基因(B$^+$,潮霉素抗性,选择标记)和巢曲霉(*Aspergllus nidulans*)trpC 基因(启动子和终止子)的 pDH25 质粒,进而制成了 pDH25RNA 的 cosmid 载体,构建野生型菌株(致病,V$^+$)基因库,经与 V$^-$菌株的互补检测表明,*A. kikuchiana* 基因组中有 3 个基因与致病性有关[69],对这 3 个基因功能的进一步研究试图表明上述特定 RNA 是由其中一个主要基因(DNA)转录产生的。

在其他例子中也有基因对基因关系的证据。HV 毒素是 *H. victoria* 致病的决定因子[25],对应于它对敏感叶绿体的作用,寄主对毒素的敏感性是由基因 Vb 决定的,Vb 由细胞质遗传[33]。HV 毒素的合成需两种酶参与作用,HTS-1 促进 ATP 积累并改变焦磷酸浓度,使脯氨酸由 L 型转变为 D 型以参与毒素合成;HTS-2 使 L 和 D 型丙氨酸形成硫胺酯而构成毒素(图 2)[73]。玉米对 *H. carbonum* 小种 1 及其 HC 毒素的反应由 Hm 基因控制,Hm 至少有两对等位基因[70]。从"非致病基因显性对抗病基因显性"的学说[21]来看,对病菌控制 HTS-1 和 HTS-2 合成的基因与菌株杂交表现出的毒素单基因遗传特征[78]之间的关系,对寄主 Hm 基因的组成和功能等,仍需研究。

目前对植物与 HST 相互作用的研究可望在两方面取得更准确的结果:①建立从真菌和植物细胞内直接测定毒素的技术,使对毒素的检测不再依赖真菌的液体培养;后一种一直通用的方法在不少情况下测定的实际上是真菌有毒性作用的某一成分,或较为复杂的成分,而不是具有毒性和作用专化性双重功能的完整毒素分子;②对毒素及其受体分子结构的精确了解,可使人们合成"探针"探测毒素分子中决定毒性或作用专化性的功能基团,这也将有助于更清楚地了解 HST 作为真菌识别因子的作用机制。很明显,对 HST 与植物专化性相互作用机制的了解最终依赖于从基因对基因关系出发所作的研究。最后,明确病菌毒素合成和它们免受自身毒素为害(毒素自抗)[74]的基因控制,相应地明确植物对毒素反应的分子遗传学机制,就可借基因操作技术,或将抗病品种的抗毒素基因引入其他性状好但抗病性待改良的品种,或将病菌的毒素自抗基因[48]按同样目的进行转移,现对后一方面的工作已有报道[15,57]。

参 考 文 献

[1] 王敬文、薛应龙,植物生理学报,1982,**3**:237。

[2] 王裕中等,植物病理学报,1989,**19**:40。

[3] 刘克明等,华北农学报,1989,**4**:74。

[4] 吴小荣等,微生物学通报,1990,**17**:116。

[5] 郭兰凯等,作物学报,1991,**17**:54。

[6] 章元寿,真菌学报,1991,**10**:169。

[7] 章元寿等,真菌学报,1990,**9**:140。
[8] 常道滔、薛应龙,科学通报,1989,**7**:537。
[9] 崔洋等,植物病理学报,1991,**21**:187。
[10] 董汉松,植物生理学通讯,1991,**27**:391。
[11] 董汉松,烟台师范学院学报(自然科学版),1991,**7**(2):66。
[12] 董汉松,植物抗性生理研究,(赵可夫主编),山东科学技术出版社。1992,193。
[13] 董汉松等,烟草学刊,1991,**3**(1):1。
[14] 董汉松等,山东科学,1993,**6**(2,植物病理专辑):39。
[15] Anzai, H. et al., Mol Gen Gener,1989,**219**:492.
[16] Bauer WD. In Asadea Y et al. (ed),Plant Infection. The Physiological and Biochemical Basis. Jpn Sci Soc Press, Tokyo. 1982,235.
[17] Bottini AT et al. Tetrahedron,Lett,1981,**22**:2723.
[18] Bull AT,Slater JH. Microbial Interactions and Communites. Academic Press,London 1982,357.
[19] Ciuffetti LM et al. Biochem,1983,**22**:3507.
[20] Daly JM. Annu Rev Phytopathol,1984,**22**:273.
[21] Daly JM. In Nishimura S et al. (eds),Molecular Determinants of Plant Diseases. Jpn Sci Soc Press,Tokyo; Springer-Verlag,Berlin 1987,199.
[22] Daly JM,Deverall BJ. Toxins and Plant Pathogenesis. Academic,Sydney,Australia,1984,81.
[23] Daly JM. Knoche HW. Adv Plant Pathol,1982,**1**:83.
[24] Danko SJ et al. Biochem, 1984,**23**:759.
[25] Datta DK et al. Ind. Agric Ultrunist, 1986,**30**:83.
[26] Declercq JP et al. Acta,Crystallogr Sec C, 1991,**47**:470.
[27] Dewey RE et al. Cell,1986,**44**:439.
[28] Dewey RE et al. Sci., 1988,**239**:293.
[29] Duvick J et al. Plant Physiol,1984,**74**:117.
[30] Forde BG,Leaver CJ. Proc Natl Acad Sci USA, 1980,**77**:418.
[31] Gardner JM et al. Phytochem, 1985,**24**:2861.
[32] Gardner JM et al. Physiol Plant Pathol, 1973,**3**:147.
[33] Gengenbach BG,Rins HW. Iowa St,J,of Res,1986,**64**:449.
[34] Gilchrist DG. See Ref 22, 81.
[35] Haramoto M et al. Annu Phytopath Soc Jpn 1985,**51**:379.
[36] Harmoto M et al. J Fac Agric Tottori Univ, 1985,**21**:10.
[37] Heiny DK et al. Mycol Res, 1991. **95**:566.
[38] Holden MJ et al. J Member Biol, 1985,**87**:151.
[39] Kodama MS et al. Annu Phytopath Soc Jpn, 1984,**50**:410.
[40] Kohguchi T et al. Annu Phytopath Soc Jpn, 1985,**51**:85.
[41] Kohmoto K. In the same works as in Ref 21,127.
[42] Kohmoto K et al. See Ref 22,253.
[43] Kohmoto K et al. Can J Bot, 1984,**62**:2485.
[44] Kohmoto K et al. Proc Jpn Acad, 1985,**61B**:269.
[45] Kondoh Y et al. Annu Phytopath Soc Jpn, 1984,**50**:407.
[46] Kono Y et al. In Durbin RD(ed),Toxins in Plant Disease. Academic,New York. 1981,p. 221.
[47] Kono Y et al. Phytochem, 1985,**24**:2869.
[48] Kumada Y et al. Antibiot, 1988,**41**:1838.
[49] Kuninaga S,Yokozawa R. Annu Phytopath Soc Jpn, 1987,**53**:368.
[50] Leach J et al. Plant Pathol, 1982,**21**:327.

[51] Livingston RS, Seheffer RP. Phytopathol, 1981, **71**: 891.
[52] Livingston RS, Scheffer RP. Plant Physiol, 1983, **72**: 530.
[53] Livingston RS, Scheffer RP. Physiol Plant Pathol, 1984, **24**: 133
[54] Maekawa N et al. Annu Phytopath Soc Jpn, 1984, **50**: 600.
[55] Maeno S et al. J Fac Agric Tottori Univ, 1984, **19**: 8.
[56] Malone CP et al. Physiol Plant, 1978, **44**: 21.
[57] Murakami TH et al. Mol Gen Gener, 1986, **205**: 42.
[58] Nakajima H, Scheffer RP. Phytochem 1987, **26**: 1607.
[59] Nakatsuta S et al. Annu Phytopath Soc Jpn, 1986, **52**: 610.
[60] Namiki F et al. Annu Phytopath Soc Jpn, 1985, **51**: 378.
[61] Nishimura S, Kohmoto K. See Ref 22, 181.
[62] Nishimura S et al. In Daly JM, Uritani I(eds), Recognition and Specificity in Plant Host-Parasite Interactions. Jpn Sci Soc Press, Tokyo; Univ Park Press, Baltimore 1979, 133.
[63] Otani H et al. Annu Phytopath Soc Jpn, 1985, **51**: 285.
[64] Payne G et al. Plant Physiol, 1980, **65**: 785.
[65] Rasmussen JB, Scheffer RP. Plant Physiol, 1988, **86**: 187.
[66] Smeeton BW, Ternouth RAF. CORESTA Inf Bull, CORESTA Symp 1990. Kallithea, 179.
[67] Tegmeier K et al. Phytopathol, 1982, **72**: 1492.
[68] Thanutong P et al. Theor Appl Genet, 1983, **66**: 209.
[69] Tsuge T, Kobayashi H. A Corp lst Natl Symp on Path Mycotox. Nanjing, China. 1991, 64.
[70] Tsuge T et al. In Yoder OC, Nishimura S(eds), Host-Specific Toxins. Tottori Univ Press. 1989, 153.
[71] Vanderplank JE. Disease Resistance in Plants (seconded). Aeademic Press, Inc, 1984.
[72] Venkatasubbaial P. J Nat Prod (Lloydia), 1990, **53**: 1628.
[73] Walton JD, Dunkle LD. Mol Plant-Microbe Inter, 1988, **1**: 128.
[74] Wernsman EA. CORESTA Inf Bull, CORESTA Symp, 1990. Kallithea, 55.
[75] Witherspoon WD et al. Crop Sci, 1989, **29**: 125.
[76] Wolpert TJ, Dundle LD. Proc Acad Sci USA, 1983, **80**: 6576.
[77] Xiao JZ et al. A Corp lst Natl Symp on Path Mycotox. Nanjing, China. 1991, 63.
[78] Yoder OC. Annu Rev Phytopathol, 1980, **18**: 103.

MOLECULAR AND CELLULAR INTERACTIONS OF PLANT HOSTS WITH MYCOTOXINS

Dong Hansong and Lu Peixiu

Interactions of host specific toxins (HSTs) of pathogenic fungi with their host plants are started from the HSTs reaching to their action sites on plant cells, undergoing the molecular recognition between HSTs and plant receptors, and finally bring about formation of special symptoms of the hosts. This is a group response of so -called compatible interactions.

Host plants can provide three kinds of cytoplasmic elements for HSTs to take as primary action sites. First, on cytoplasmic membranes, at least 5 species of HSTs initiate

primary roles which are characterized by fast membrane damage indicated by electrolyte leakage. In this group, 4 HSTs, AM-, AK-, AF- and ACT-toxins are produced respectively by *madi*, *kikuchiana*, *fasciculata* and *citri* pathotypes of *Alternaria alternata*, and the other, AS-toxin, by *Helminthosporium sacchari*. All of the toxins are synthesized in more than two isotypes, with one molecule component of activity and others of so-called structural analogues. Secondly, on mitochondria, the second group of HSTs finds their action sites and cause fast damage of the mitochondial cristae as an early indication of action of this group toxins. Such toxins include T or HMT-toxin of *H. maydis*, PM- of *Phyllosticta citri*, and AT- and ACR-toxins respectively of tobacco and lemon pathotypes of *A. alternata*. These 4 toxins are also active in a function isotype in the more than two isotype analogues. By the way, the pathotypes of *A. alternata* are distinguished mainly on host specificity of toxins by Japanese phytopathologists, and the correlations of such pathotypes with pathogenicity expression of them are remained to be qualified especially as related to the taxonomy of this group of fungi. The third site of HSTs to act primarily is chloroplast, on which the HV-toxin(victorin)produced by *H. victoriae* disturbs major steps in the photosynthesis, such as CO_2 fixation in darkness. Otherwise, it is suggested that some toxins act directly at certain enzymes of plants. Also, a few HSTs can act on more than one sites.

After a toxin is produced by a fungus, it diffuses around the host surfaces and then reaches to the primary action site, where the toxin as recognition factor binds with receptor on the action site. This toxin-receptor binding is specific and can be inhibited by structural analogues of the toxin or receptor. The receptor of oat for HV-toxin and receptor of pear for AK-toxin are evidenced to be sulfhydryl-containing molecules. Such a molecular recognition of toxin with its receptor can cause series of plant responses leading to pathogenesis. A scheme has been presented by Kohmoto for AK-toxin. The plant responses caused by this toxin occur in the following sequences: binding of the toxin on the cytoplasmic membranes is followed firstly by O_2-conditioned process which is a prelude of the membrane damage resulting in electrolyte leakage; the coming events are the *de novo* synthesis of proteins for which the corresponding mRNA has been elicited to form, and such *de novo* proteins are believed to be responsible to the membrane alternations; next is production of proteins with potential of killing the membranes. Serious damage of cytoplasmic membranes by the killing proteins can bring about death of membranes, and this event finally induces death of the cells and necrosis of tissues.

The specificity of the toxin-receptor interactions is dependent on structures of toxins. It is found that certain correlations exist between toxin structures and their primary action sites, and that each toxin or each group of toxins have certain function residues which can make specific binding of the toxin with its receptor and determine the host range.

Researches on genetics of HST-plant interactions have been done in the manner of

gene-for-gene relation. Some detailed informations have been accumulated at least for T, HV- and AT-toxins, which indicate two kinds of expressions of the gene-for-gene relation: interactions of host susceptible genes with toxin-encoding genes lead to specific compatibility, such as oat V_6 gene with *H. victoria* Hm gene which is found to control at least two critical metabolisms in the toxin synthesis; absence of susceptible genes of hosts results in incompatibility. But for T toxin, mitochondria of cms-T maize response differently. The susceptible mitochondria contain a particular DNA sequence encoding a 13 kDa peptide , while resistant one lacks this DNA sequence and has another encoding a 21 kDa peptide. The existence of such a 21kDa gene suggests the third expression of gene-for-gene relation: incompatibility can be also determined by resistant genes of plants. A recent evidence has been given by Johal et al. , who cloned maize HM1 gene which encodes the NADPH-dependent HC-toxin reductase (HCTR). The enzyme HCTR can inactivate the race-specific HC-toxin produced by *Cochliobolus carbonum* (Science, 1992, 258: 985—987).

From practical purposes for plant disease control, understanding on genetic, molecular and cellular mechanisms involved in the interactions of HSTs with host plants is beneficial at least to: ①transferring the resistant gene such as HM1 from incompatible to compatible cvs; ②utilizing the fungal genes for self-resistance to its own toxins, and ③ biochemically and cellularly using toxins as resistance inducers with more definite aims.

植物诱导抗病性的电生理学

李怀方

植物电生理学是植物生理学和生物物理学、电子学交叉产生的边缘学科，利用物理学中的基本概念和原理、电子学与微电子学的技术和方法来研究植物的生物电(bioelectricity)现象，揭示其内在规律性。植物电生理学与植物病理学的交叉，形成了植物抗病性的电生理学新分支。

植物电生理学的发展大致可以以70年代为界分为两个时期，70年代以前为电生理学的起始期，主要是从植物的整体或组织水平认识植物的电现象，研究、探索、检测植物体微弱电信号的方法。80年代以来，随着微电子技术的飞速发展，电生理学的研究方法日益完善，研究内容逐步深入到细胞和离子通道(ion channel)的水平。

植物电生理学研究的最基本依据是生物的带电特性，像人体具有生物电一样，植物也存在生物电。生物电是一种生物能，既是生物生化反应、分子之间相互作用的原动力，也是反应、互作结果的总体体现。在研究生物间相互作用的时候，需要深入到组织、器官水平；研究细胞相互作用的时候，需要深入到分子水平；而在研究分子间相互作用的时候，离不开分子的荷电状态。因此，植物电生理学在超微观水平上依据的是分子、基团、离子的带电性，在微观水平上依据的是细胞膜对细胞器严格的分室，使电子的传递沿着不同的线路有控制地进行；在宏观水平上，植物整体的电特性正是这些微观和超微观水平上各种"电网"负载消耗后输出的结果。理清这些"电网"的电路目前尚且为时过早，这将是这一交叉学科将来的任务。

植物诱导抗性的电生理学更注重植物电信号在植物感病或抗病机制中的作用，特别是利用特殊的电生理学仪器设备诊断植物病害、鉴定植物的抗感病性，探讨通过矫正或治疗异常电信号进而控制病害发展的可能性。我们企盼着植物电生理学与植物病理学广泛地结合，使属于植物病理学家的"听诊器"、"X线机"甚至"CT机"早日成为现实。

一、植物主要生物电参数及其测试原理

衡量植物电特性的参数可以分为交流电参数和直流电参数两类，包括组织电阻(resistor)、电位(potential)、电流(current)、电容(capacitor)、交流阻抗(impedance)等。与动物相比，植物生物电的直流成分较多，变化频率较低，由于细胞壁的存在测试难度较大。

1. 细胞膜和植物组织的等效电路

植物电生理学研究已经揭示了植物细胞和组织的基本电特性，这些特性可以用图1、图2等效电路来说明。细胞的电特性主要起源于细胞膜，膜对各种离子的严格选择透性决定了膜的电阻特性，图1中分别表示了钾电阻(r_K)、钠电阻(r_{Na})、氯电阻(r_{Cl})、其他离子电

阻(r_x),它们相互并联成为膜电阻 r_m;膜两侧是电解质溶液的导体,这种结构特点赋予细胞膜电容器的效应,用 Cm 表示;膜两侧离子浓差以及致电泵(electrogenic pump)等原因造成的电位差即膜电位 Em,是由各种离子的扩散电位(Ex)按并联关系构成;r_i、r_o 分别表示胞内电阻和胞外电阻。

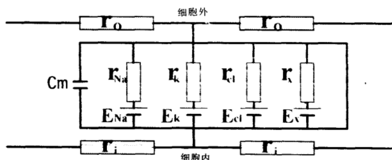


图 1 细胞膜一个单元的等效电路(引自北京农业大学生物学院植物生理教研室,植物组织电阻测定的基本理论和技术。北京农业大学教材,1986,16—18)

Fig. 1 The equivalent circuit of a unit on cytoplamic membranes

由众多细胞构成的植物活组织的电学性质是由这些细胞各自的电特性按照一定的关系相互连接而成。由于细胞间存在胞间连丝,使得相邻细胞的原生质相互勾通,形成了离子交换的低阻通道,这种现象被称为细胞间的电偶联(electric coupling),是我国科学家娄成后发现的[1],这种电阻叫做胞间电阻 r_{pd}。在植物组织电阻测试中,采用稳恒直流电源以及通过电位补偿可以消除组织两端的电位差,同时电容 Cm 的作用在直流下也不能发挥;因此组织的等效电路可以简化为图 2 所示。

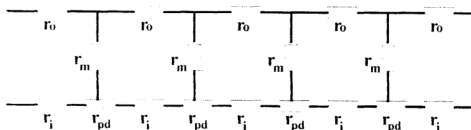


图 2 一段植物组织的简单模拟电路(引自北京农业大学生物学院植物生理教研室,植物组织电阻测定的基本理论和技术,北京农业大学教材,1986,16—18)

Fig. 2 A simplified model from Fig. 1 plant tissues

2. 组织电阻(Rt)

由以上电路分析可知,植物 Rt 反映的是细胞膜的透性和胞间电偶联的程度,因此,

任何影响到细胞膜和细胞间隙的生物或环境因子，均可以通过 Rt 的测定反映出来。所以 Rt 是逆境生理和抗性生理中常用的测试参数之一。

Rt 的测量首选的方法是中段电压降法[2]，北京农业大学植物生理教研室专门设计了 FL-3 型植物组织电阻仪；该仪器应用 1μA 的恒流到测试组织上，然后测定组织中段的电压降，有效地消除了干扰。在田间或整株测试时，采用高输入阻抗数字表加去极化电极的方法，也可以获得可信的结果[3]。

3. 电位

电位的测量按检测方法可以分为直接测量和间接测量两类，按照测试的材料可以分为组织测试、细胞测试等。

直接测量是最常用的，用适合的电极(electrode)与待测组织或细胞连接起来，用高灵敏度电压表测定其电位变化。使用的电极依据测定材料的不同而变化，主要有用于树木枝条的不锈钢电极、用于柔软组织的铂金电极、银-氯化银电极以及用于细胞内测定的玻璃微电极等，参比电极大多采用甘汞电极。采用的显示或记录仪器则依实验目的而有繁有简，不一而论。

记录到的电位类型主要有两类，一类是可以在组织内传导的电位，包括动作电位(action potential，Ap)和变异电位(variation potential，Vp)；这类电位反映的是植物对外界刺激的迅速反应能力——细胞的可兴奋性；其生理功能主要是信息的传递，尤其在逆境信息的传递方面[4,5]。另一类就是细胞膜电位(Em)，是用微电极插入植物细胞内测出的，其大小也反映出植物细胞膜的功能及其完整性。

植物组织电位的直接测量或多或少会对植物的正常生理造成影响，主要由于电极插入细胞时的刺伤和接触。为了解决这个问题，Jaffe 和 Nuccitelli 发明了一种振荡电极(vibrating probe)，在外加电场的驱动下，距离非常近的两个电极以一定的频率振动，借以测定两电极间微小电场的存在[6]。

4. 离子通道测量

有一种特殊的方法——斑片钳制法(patch clamp，PC)，用微电极技术吸取一小片细胞膜，在无其他干扰的情况下，研究离子进出细胞膜时电流的方向、大小、离子的受体、离子通道的阻断、开放等机制；这些研究对于明确细胞膜的功能、离子通道在传递信息中的作用、生物电的起源甚至生物适应环境的机制均能提供有力的证据[7]。相信离子通道研究技术也将被植物病理学家采用。

5. 植物表面电流

1986 年英国科学家 Bowling[8]等利用振荡电极检测到鸭趾草(*Commelina communis*)气孔开放与叶表电流的变化，并证明这是一种 H^+ 电流，还利用电流检测的方法设计了一个电子气孔计[9]。作者则证明植物叶表电流与植物逆境、诱导抗性密切相关[10]。叶表电流测试使用非伤害型的接触电极，袖珍数字表显示结果，灵敏度高，携带方便，特别适合于田间测定。

二、电生理学与植物病理学

从上述理论基础和测试原理可以看出，植物电生理学技术是阐明植物与病原物相互作用机制的重要手段之一，它不仅可用于生理性病害，更可以应用于侵染性病害；尤其是病害互作中的原初反应大多发生在细胞膜上，电生理技术可以提供更直接、更有说服力的证据。

1. 植物逆境抗性的电生理学

由于抗逆生理属于植物生理学的内容，首先受到电生理学者的重视，所以这方面的内容最多。从诱导抗性的角度看，植物对非生物逆境的反应与对病原物的反应有很多的相似性，植物诱导抗病性和植物诱导抗逆性都具有广谱性和作用的相互交叉。因此，其结论可供病理学参考，其方法可供借鉴。

1979 年，加拿大科学家 Wilner 和 Brach 收集了 28 个国家关于生物电研究的 485 篇资料[11]，统计结果表明，其中 53%的研究属于抗寒性和抗旱性，42%的研究属于活细胞的生物电特性，只有 5%属于除草剂、施肥、浇水等其他方面。涉及的植物有 47%的树木和观赏林木、39%的大田作物和园艺作物、14%其他生物材料。结论性的结果录于表 1 供读者参考。

表 1　植物抗逆性电生理研究结果摘要

Table 1　Major results of studies on electrophysiology of plant adversity resistance

测试参数	主要结论
电解质渗漏	与霜害、冻害的程度成正比；用于选择抗寒品种；精确地区分种子的死活；用于确定不饱和脂肪酸的含量
电导	显示不同品种间的差异；区分树皮的死活
电阻抗	与树木内部腐烂的程度成反比，与果实成熟期间的呼吸成反比；与作物抗寒成正比；与抗霜害成正比；用于评价杂草根的生命力、确定植物的生命力强弱；区分植物品种的不同
电位	证明树木存在电极性；果实成熟期间电位显著降低；用于检测毒物对树木的影响
电阻	检验杂草的死活；与耐低温性成正比；与抗霜害成正比；评价种子的生活力；确定对虫害的感受性；检测活树中的腐烂组织
应用电流或电场对植物的影响	刺激离子吸收和植株生长依赖于电流的方向；提高发芽率和发芽速度，增加产量；刺激生产，促进成熟，增强抗病性；用于花粉产生变异品种；打破植物间的不亲和性；促进插条生根；静电场处理增加产量和过氧化物酶活性

注：以上资料主要摘自文献[11]之表 1。

从以上资料可以看出，绝大多数研究用电生理学方法成功地解决了逆境检测问题，说明这些电生理学参数可以鉴别植物生命力的强弱，检测不同逆境的存在以及植物抗逆性的差异。

2. 植物-病原物互作的电生理学

从病原物侵染植物的整个过程来看，初期的相互识别是大分子的互作，是个别细胞的

反应和电特性的变化；侵入以后不管是否形成可见的症状，实际上已经对植物细胞造成了损害，此时是局部组织或群体细胞的反应；随着症状的出现，参与的组织面积逐步扩大，电信号的强度也逐渐增加。从理论上讲，发生在细胞膜上的大分子互作的电信号应当可以检测到，但是受到技术和外界干扰的限制，70 年代以前主要检测的是侵入以后的电参数变化；80 年代以来的结果则可以检测到接种后数小时甚至数分钟内的变化。从这些研究结果(表 2)可以看出，电生理学方法具有常规病理学方法和生物化学方法不具备的优点，这就是研究分子互作的原初反应、进行活体检测、可以早期诊断兼具治疗作用。

表 2 植物侵染性病害电生理学研究的主要结果摘要

Table 2 The critical results of electrophysiology researches on plant diseases

病害类别	主要研究内容与结果	文献 *
真菌病害		
甜菜蛙眼病	·用电解质渗漏方法证明辐射可以增加植物的抗病性	A382
甜菜蛙眼病	用电解质渗漏方法确定植物的感病性	A47
葡萄霜霉病	用电流处理土壤增加葡萄对霜霉病的抗病性，处理组织的电导低，但保水能力强	A129
白菜棒根病	用金属电极对土壤进行电处理，不能有效地控制病害	A160
鳄梨/疫霉	接种后 48－72 小时，两个抗病品种的电导显著小于 6 个感病品种	12
小麦锈病	直流电阻用于某些小种侵染程度的测试	A294
芽管向气孔生长	关闭的气孔周围出现 H^+ 梯度，气孔打开或用壳梭孢素(真菌毒素)处理使其消失；表明锈孢子是靠离子电流的感知而确定气孔的位置的	13
腐霉病害	用电导电桥可以迅速、准确地测出腐烂真菌	A410
马铃薯晚疫病	病菌侵染导致马铃薯切片上细胞膜电位升高 50mV	14
疫霉游动孢子	在弱电场下游向负极，鞭毛对根表面的附着受静电力的影响	A420
疫霉游动孢子	烟草根尖和伤口产生 2－70mA m^{-2}离子电流，亲电性可能是游动孢子进行根尖感病区定位的机制之一	15
真菌激发子	两种真菌来源的激发子使植物细胞膜去极化	16
小麦白粉病	播种前进行种子的电处理使白粉病发病率由 40.6%降低到 10.8%	17
甘蔗长蠕孢毒素	甘蔗细胞膜电位在毒素处理(0.1－1.7μ mol/L 浓度)4－10 分钟以后出现去极化(膜电位升高)，作用依赖温度变化	18
细菌病害		
苹果增生病	用交流电桥测定苹果根的阻抗，可以寻找到病树	A92
番茄肿瘤病	用直流电阻测定可以在肿瘤出现之前测出病株	A471
对细菌的 HR	棉苗子叶接种假单孢杆菌 2 小时后，细胞膜电位开始升高，10 小时后升高一倍(－188mV 变到－99mV)	19
棉花疫病	棉花子叶接种细菌后 48 小时，用微电极测得健康植株不存在的光、暗条件下 80mV 的电位差	20
病毒病害		
草莓病毒病害	用高压电处理可以获得比热处理更好的脱毒效果	A131

(续表 2)

病害类别	主要研究内容与结果	文献*
马铃薯病毒病	利用 10kHz(千赫兹)交流阻抗、组织相位角作为区分受病毒侵染的马铃薯块茎的参数	A147
橡胶木化病毒	患病的枝条显示高电导读数,可以测出病枝以利砍除	A235
烟草环斑病毒	受侵染豇豆的叶肉细胞膜电位出现不同于健株的去极化(depolarization)和超极化(hyperpolarization)现象	21
豆褪绿斑驳病毒	病、健组织的细胞膜电位在光照条件下相似,但在黑暗条件下侵染细胞显示去极化作用	22
病毒-寄主组合	利用自行设计的交流电桥,测试了多达 24 个电参数,结果表明,区分不同病毒-寄主组合的参数也不同	23
烟草花叶病	病毒接种、诱导抗性及环境等因子大多使叶表电流增加,过敏性枯斑周围存在明显的叶表电流梯度	10
其他方面		
根坏死线虫病	检测苜蓿植株的交流阻抗可以区分病、健植株	A174
综述文章	植物病理学中的电生理研究	A401
	用电生理学研究植物病害的发展	24
	病害相关的膜功能的变化	25
	根-游动孢子相互作用的电生理学	26

* 带 A 文献号码为文献[11]中的编号,由于文献量太大,恕不能一一列出。

从表 2 可以看出,植物电生理学已经涉及到植物病理学的很多方面,真菌、细菌、病毒、线虫等各类病原物,传统病理学中的病原物习性、病害诊断、病生理、致病性、抗病性、病害预防和防治等内容,现代病理学中的植物-病原物的互作、生物大分子间的相互识别、毒素以及离子在病理学中的作用等方面。

综合现有的研究结果,可以得出以下结论:①细胞膜电特性对环境变化最敏感,患病或逆境处理一般导致细胞膜去极化、电解质外渗、电阻减小、电导增加;细胞膜正是病原物与寄主植物发生原初反应的位点,是揭示抗、感病机制的关键所在;②生物电可以作为病害诊断或品种抗性鉴定的重要参数,由于测定的是发病早期的变化,因而具有更好的测报价值;但由于生物电参数的影响因子多,测试应尽量保持环境条件的一致;对不同的植物-病原物组合应探索各自适宜的测试参数;③外源电场的植物利用、内源信号的模拟具有诱人的潜在前景。

3. 抗病信息传递中的电生理学

植物信息的传递近年来受到科技界的广泛重视,特别是逆境信息和抗病信息及其传递。Gurr 等在其分子植物病理学第二卷中以一个部分(10—12 章)介绍信号传导途径[27],Verma 专门著书《植物-微生物通讯中的分子信号》论述病程中的信息传递[28]。植物抗逆信息的传递现象是很多年前就知道的,如植物对病毒过敏性反应的信号可以由处理叶向上传导[29];但是部分揭示这些现象的机制却是近些年的事情。目前生物化学方法揭示的参与信息传递的主要是些小分子化合物如寡糖、脂肪酸、激素、水杨酸、钙调蛋白等[27,28](本书:激发子及其作用模式;富羟糖蛋白及有关防卫反应),而电生理学方法揭示的则是

电位。

美国 Nebraska 大学 Davis 教授提出了动作电位(Ap)作为植物多功能信号的假说[4]，Ap 在动物神经传导中已经被证明是信息传递的动力。Davis 在分析了大量资料后认为，Ap 在细胞间、组织内通信中起重要作用，长距离通信靠膜电位的变化获得，短距离的局部信号靠离子(K^+、Cl^-和Ca^{2+})局部变化获得。已有证据表明 Ap 参与很重要的离子出入细胞膜的过程，参与细胞壁中某些酶的变化、调节蛋白质的合成。这种 Ap 在植物体的传递速度虽然比动物体慢，但相对其他生化反应，它还是很快完成的，持续时间 1－2 分钟，传递速度 3－5cm/分钟。

另外，对伤害诱导的变异电位(Vp)也有了一些深入的研究[30]，它更有可能是参与非敏感植物防卫反应的一种快速变化。对于小分子信息物质与电位的关系，目前尚未见直接的研究结果，但由于它们作用于细胞膜，应当有复杂的相互作用；通过下面离子通道防卫模型的介绍，可以看出它们之间的某些关系。

4. 离子通道防卫模型(ion channel defense model，ICDM)——基因对基因识别的新解释

ICDM 是由美国和澳大利亚学者联合提出的[31]，该模型的基本内容是："基因对基因"中的抗病基因是编码膜结合蛋白的结构基因，这种膜结合蛋白既是专化性分子(病原物非毒性基因的产物)的受体，又可以起离子载体(ionophores)的作用，二者专化性识别后，膜结合蛋白的构像变化，离子通道打开，Ca^{2+}由毫摩浓度的细胞间隙进入微摩浓度的细胞内，活化钙调蛋白(calmodulin，CaM)系统；K^+等其他离子由高浓度的细胞内外流，即细胞质渗漏，使细胞膜去极化最后导致细胞死亡；不同的膜结合蛋白及其专化性分子决定了过敏性反应的专化性。笔者认为该模型更适用于广泛的诱导抗性的解释：这些专化性分子(在这里暂且认为是信息分子)不应限于非毒性基因的直接产物，还应当包括植物-病原物互作中产生的任何可以和细胞膜上的受体作用的物质(导致细胞膜去极化)；目前已经揭示了一些信号分子的膜受体蛋白[21]；这种受体蛋白也不应仅限于直接有离子载体功能的蛋白，应当包括可以影响到离子通道特性的膜结合蛋白；膜上的识别反应作为初级信号，而细胞膜的去极化电位、离子进出的变化作为信息的放大和传导，活化周围细胞的防卫反应；受体-信号分子间的识别是专化性的，但是激发的防卫反应是相似的，这可以解释诱导抗性的广谱性。生物化学和分子生物学方法在揭示植物诱导抗病性方面确实发挥了很大的作用，并且还将继续发挥作用；但是，蛋白质的翻译和核酸的转录由于发生的时间太晚，因而不是识别反应的原初机制；而且这些研究大多是在破坏植物细胞或者离体的情况下测定的，和植物活体有所不同。植物电生理学则正好可以弥补这一缺陷，研究活细胞膜上发生的反应，揭示分子互作过程的原始机制。因此，电生理学与现代分子病理学的结合可以将诱导抗病性的研究推向一个新阶段。

参 考 文 献

[1] 娄成后，植物体中原生质的连续性。植物学报，1955，4：182－222。
[2] 祝宗岭、何鉴钢、娄成后，在稳流下测量植物组织电阻的中段电压降法。植物生理学通讯，1982，(1)：54－58。

[3] 张宪政等，一种植物叶片电阻测定法——ZD型植物电阻测定夹。植物生理学通讯，1986，(6)：57－58。

[4] Davies, E. Action potentials as multifunctional signals in plants: a unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses. Plant Cell & Environment, 1987, **10**: 623－631.

[5] 梁 峰，非敏感植物在各种处理下的电化学波传递。北京农业大学硕士论文，1987。

[6] Jaffe, L. F., Nuccitelli, R. An ultrasensitive vibrating probe for measuring steady extracellular currents. J. Cell Biology, 1974, **63**: 614－628.

[7] 许 越，邱泽生，膜片钳技术及其在高等植物细胞研究中的应用与展望。植物生理学通讯，1993，**29**(3)：169－174。

[8] Bowling, D. J. F. et al. Electrical current at the leaf surface of *Commelina communis* and their relationship to stomatal activity. J Exp Bot, 1986, **37**: 876－882.

[9] Bowling, D. J. F. A new porometer based upon the electrical current produced by guard cells. J Exp Bot, 1989, **40**: 1407－1411.

[10] 李怀方，植物抗病毒侵染机制的电生理学研究。北京农业大学博士论文，1992，2－28。

[11] Wilner, J., Brach, E. J. Utilization of bioelectric tests in biological research. Contribution, Engineering & Statistical Research Institute. Agriculture Canada, 1979, 1－139.

[12] Zilberstein, M., Pinkas, Y. Detached root inoculation—a new method to evaluate resistance to *Phytophthora* root rot in avocado trees. Phytopathol, 1987, **77**: 841－844.

[13] Edwards, M. C., Bowling, D. J. F. The growth of rust germ tubes towards stomata to pH gradients. Physiol. Mol. Plant Pathol, 1986, **29**: 185－196.

[14] Tomiyama, K., Okamoto, H. Effect of pre-inoculational heat-treatment on the membrane potentilal change of potato cell induced by infection with Phytophthora infestans. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1989, **35**: 191－201.

[15] Miller, A. L., Shand E., Gow, A. R. Ion currents associated with root tips, emerging laterals and induced wound sites in *Nicotiana tabacum*: spatial relationship proposed between resulting electrical fields and phytophthoran zoospore infection. Plant Cell and Envir, 1988, **11**: 21－25.

[16] Pelissier, B., Thibaud, J. B., Grigno, C. Cell surface in plant-micro-organism interactions from two fungal pathogen depolarize plant membrane. Plant Sci. 1986, **46**: 103－109.

[17] Firsco, V. F. et al., Effect of electrical treatment of seeds and seeding rates on the tolerance of powdery mildew in wheat. Mikologiya Fitopatologiya, 1987, **21**: 374－376.

[18] Schrter, H., Novancky, A. Effect of *Helminthosporium sacchari*-toxin on cell membrane potential of susceptible sugarcane. Physiol, Plant Pathol, 1985, **26**: 165－174.

[19] Pavlovkin. J., Novancky, A. Membrane potential changes during bacteria-induced hypersensitive reaction. Physiol. Mol. Plant Pathol, 1986, **28**: 125－135.

[20] Novancky, A. Relationship between membrane potential and ATP level in *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* infected cotton cotyledons. Physiol Plant Pathol, 1982, **21**: 237－249.

[21] Stack, J. P, Tattar, T. A. Measurement of transmembrane electro-potential of *Vigna sinensis* leaf cells infected with tobacco ringspot virus. Physiol. Plant Pathol. 1978, **12**: 173－178.

[22] Tattar, T. A. Membrane potentials of cowpea leaves infected with cowpea chlorotic mottle virus. In: Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues (Spanswick, R. M., Lucas, W. J., Dainty, J. eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press 1978, 621－622.

[23] Greenham, C. G., Helms, K., Miller. W. J. Influences of virus infections on impedance parameters. J Exp Bot, 1978, **29**: 867－877.

[24] Novancky, A. et al. Using electrophysiology to study plant disease development. Bioscience, 1976, **26**: 499－504.

[25] Novancky, A. Disease-related alteration in membrane function. In Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues (Spanswick, R. M., Lucas, W. J., Dainty, J., eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press 1980, 369－380.

[26] Gow, N. A. R., Morris, B. M., Reid. B. The electrophysiology of root-zoospore interactions. In: Perspectives in

Plant Cell Recognition (Callow,J,A. ,Green,J. R. ,eds). Cambridge Univ. Press,1992,173—192.

[27] Gurr,S. J. ,McPherson,M. J. ,Bowles,D. J. Molecular Plant Pathology A Practical Approach Vol. Ⅰ. Oxford Univ. Press,1992,159—232.

[28] Verma ,D. P. S. Molecular Signals in Plant-Microbe Communication. CRC Press, 1992.

[29] Ross, A. F. Systemic effects of local lesion formation. In Viruses of Plants (Beemster, A. B. R,, Dijkstra, J. eds.). North-Holland Publishing Co. Amsterdam,1966,127—150.

[30] Roblin,G. Analysis of the variation potential induced by wounding in plants. Plant Cell Physiol. 1985,**26**: 455—461.

[31] Gabriel ,D. W. , Loschke, D. C. , Rolfe, B. G. Gene-for-gene recognition: the ion channel defense model. In: Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions(Palacios,R. ,Verma,D. P. S. eds.). APS Press,1988,3—14.

ELECTROPHYSIOLOGY OF INDUCED RESISTANCE OF PLANTS TO DISEASES

Li Huaifang

Plant electrophysiology (PEP)is based on the functions and integrates of cell membrane to study plant bioelectrical characteristics and its transfer rules in plant under various stresses. The progress in PEP has supported the studies on pathogen-host interactions in phytopathology, especially provided principles and methods for induced resistance.

The research history of PEP, various factors in the equivalent circuit of cell membrane and plant tissue, electrical parameters of plant such as tissue resistor, potential, ion-channel, surface currents are briefly reviewed. The conclusion results from many references studying on stress electrophysiology are listed, which revealed that the PEP methods are more practical to detect the presense of various stresses and to differentiate the resistance of plants to stresses. To reveal the effects of PEP parameters in the pathogen-host interactions, the research results of several dozen combinations of pathogen -host including fungus, bacterium, virus and nematode diseases are tabled and summarized. The results showed as follows: Cell membrane is the key site for discovery of the mechanism of plant resistance or susceptible to pathogen infection. Infections or stresses result in the depolarization of cell membrane, exosmosis of electrolyte, decrease of resistance and increase of conductance. Measurements of bioelectric parameters are important methods for early diagnosis of diseases and the identification of cultivar resistance. The regulations of bioelectric field and mimic of endogenous electric signals are very attractive to control diseases and plant growth. PEP researches are related not only to pathogen habit, disease diagnosis, phytopathological physiology, dissease resistance, diease control etc. in traditional phytopathology, but also to pathogen-host interactions, recognition between biomolecules, the effects of toxin and ions in modern phytopatholo-

gy. All of those provide much direct or indirect evidences for induced resistance.

The possible effect of electric signals in signal transduction of plant resistance to pathogen infection is briefly discussed and a new explain of gene-for-gene recognition, the ion-channel defense model is also briefly introduced.

超氧化物歧化酶及其与植物的抗病性

李世东

一、引　　言

大约在 30 亿年前，地球上氧气的逐步出现为原始生物中更有效的能量代谢途径的形成提供了条件。以后需氧生物不断出现，并达到空前繁荣的局面。发展到今天，以至于包括人类在内的绝大多数生物离开了氧气就不能生存。但是，和世界上其他任何事物一样，氧气在促进生物进化繁荣的同时，也表现对生命有危害作用的一面，那就是导致生物组织器官的氧化、衰老直到死亡。然而，在漫长的进化过程中，生物体也发展了一系列避免和减轻氧毒害作用的机制。超氧化物歧化酶(super-oxide dismutase，简称，SOD 酶)即是其中之一。

自 60 年代末发现该酶[1]以来，全世界众多的科学家曾从生理学、生物化学和分子生物学等角度对其进行了大量的研究，得出了许多非常有意义的结果。研究发现该酶的状态不仅直接与细胞的老化和死亡有关，而且在研究生命起源和进化上也有重要的意义。在医学上，已经证实如果人体该酶的底物超氧化物自由基(superoxide free radical，$O_2^{\cdot -}$)过多积累或该酶的功能受损时，就会发生人体组织的伤害。临床上许多病症如糖尿病、肺气肿、白内障、各种急慢性炎症以及肿瘤和衰老等都被证明与 SOD 酶的状态有关。因此，该酶在医药卫生界已被列为明日之药。这方面的研究历史较久，文献数量十分庞大。关于植物 SOD 的研究也有许多报道，但无论从深度上还是广度上都无法和医学上 SOD 的研究相比。关于 SOD 酶和植物抗病性的相关研究文献数量也不算多。本文企图对这方面已有的一些结果作一概略的介绍，以期能为今后这方面工作广泛深入地开展提供一些借鉴。

二、自由基、活性氧和 SOD 酶概述

氧对生物体的毒害作用是通过活性氧对细胞组分的破坏来实现的。所谓活性氧是泛指那些含有氧原子的但较氧具有更活泼的化学反应性的氧的某些代谢产物及其衍生物。超氧化物自由基也是活性氧的一种，它是由氧分子从外界捕获一个电子而成。由于好氧生物体所处环境到处都有氧分子的存在，因此 $O_2^{\cdot -}$ 的生成也是十分普遍的。例如，在正常生理状态下，约有 1－4%的 $O_2^{\cdot -}$ 可逃逸正常的呼吸电子传递链，而被直接还原为 $O_2^{\cdot -}$，在线粒体的结构和功能受损时，$O_2^{\cdot -}$ 的产生量更大。在光合电子传递过程中，也可不断有 $O_2^{\cdot -}$ 的生成。生物体内的活性氧种类除了超氧化物自由基以外，还包括：①羟自由基(hydroxylradical)：即 $\cdot OH$，可由 $O_2^{\cdot -}$。经 Haber-Weiss 反应而来($O_2^{\cdot -}H_2 + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{3+}} \cdot OH^- + OH^- + O_2$)，它具有非常强的氧化能力，是目前已知化学性质最活泼的活性氧；②单线态氧(singlet oxygen)；c. 脂类过氧化物：包括不饱和脂肪酸(RH)被其他自由基氧化而产生的

R·、RO、ROO·等自由基和ROOH;d. H_2O_2 等。这些活性氧之间是可以相互转化的,因此在研究工作中不能孤立地看待某一种活性氧的危害。

活性氧对机体的伤害效应是多方面的。在医学中,已知电离辐射对机体的伤害、癌症的发生以及其他多种心、肺、肾、脑和消化等系统中的疾病都与活性氧的参与有关。在植物中也已证明活性氧与外界多种逆境对机体的伤害有关,至于其伤害的分子机制,虽然也有关于自由基可攻击核酸和蛋白质并致其失去功能的报道,但多数研究都集中在活性氧对脂类的过氧化作用以及由此而造成的对生物膜的损伤作用。但是,活性氧对生物机体也不是有百害而无一利。它们对生物机体也有有利的一面,甚至缺少了它们,生物机体就不能存在。目前已知活性氧在人体内参与前列腺素、凝血酶原和胶原蛋白的合成、通过羟化解毒原理参与机体对某些外来有毒物质的解毒作用,参与吞噬细胞的杀菌过程,在植物中有可能参与过敏性坏死反应(HR)的发生和木质素的合成等。因此,活性氧在机体内的存在既不能没有,也不能过量,以控制在适度为宜。

生物体在长期的进化过程中,在利用氧的同时也发展出了一系列消除活性氧为害的机制。这些机制中有些是通过非酶物质,如维生素E、抗坏血酸、尿酸、β-胡萝卜素、NADH等来实现的,有些则是通过酶促反应实现的。表1列出了生物体内活性氧的一些主要酶促代谢步骤。从表中可以看出,生物体内的活性氧代谢是一个非常复杂的过程。其中SOD酶在这一过程中处于很关键的位置。和其他几类氧化酶类一样,SOD酶也包含有多种同功酶。按所含金属离子的不同可分为CuZnSOD、MnSOD和FeSOD三大类。其部分性质总结于表2。迄今,已有多种生物的CuZnSOD和MnSOD酶的氨基酸全序列分析工作被完成,SOD酶的高级结构和催化机制也已得到部分阐明[2,3]。但是,目前对SOD酶活的测定方法仍颇多争议。由于SOD酶的催化底物 $O_2^{\cdot-}$ 化学性质很不稳定,且又不易制备,故而很难像一般酶学实验中那样以单位时间内产物生成量或底物消耗量来直接测定酶的活力。目前,SOD酶活多是采用所谓的"化学法"进行间接的测定,其基本原理是利用一个 $O_2^{\cdot-}$ 的产生系统(可用酶学、光化学、电化学等方法)和一个 $O_2^{\cdot-}$ 的监测系统(可为细胞色素C、NBT、hdroxyl amine、lumino等),然后通过SODs抑制被监测物(detector,即细胞色素C和NBT等)被 $O_2^{\cdot-}$ 氧化或还原的数量来间接表示SODs的活性。这类方法的优点是简便快速,因而为许多研究者所采用,其缺点是干扰因素太多,结果不十分可靠准确。其原因在于 $O_2^{\cdot-}$ 和detector的反应特异性不强,生物组织提取液中除SODs可清除 $O_2^{\cdot-}$ 外,其他许多物质如Ve、Vc和血浆铜蓝蛋白等也可抑制detector的被氧化和还原。另外,生物组织提取液中的某些物质还会通过和 $O_2^{\cdot-}$ 产生系统中的某些物质发生反应,从而影响到 $O_2^{\cdot-}$ 的产生量,这种影响也极易和SODs对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力混同。因此,用这些方法所测出的所谓SODs的"活性"其实并不完全是SODs所为。严格说来,这种活性应称之为"类SOD活性"(SOD-like activity)。其他一些方法,如分光光度法、电子顺磁共振波谱法、电泳谱带扫描法、免疫学法等都有这样或那样的缺点。因此,目前对SOD酶活的测定仍急需进一步的改进。

对SOD酶作为生物抵抗逆境的重要因子之一这一结论,虽然自其被发现以来就一直得到许多研究的支持,但是在早期的许多试验中由于对所用方法尚存疑虑,而且所用的实验材料遗传背景各异,有时难于将一些生物学现象(如抗逆、抗衰老等)完全归因于 $O_2^{\cdot-}$ 和SODs。因此,认为这些实验的说服力不强。基因工程技术的发展为解决这一问题提供

了手段。迄今，这方面的研究报告已相当之多，所用试材涉及小鼠、果蝇、大肠杆菌、烟草和人体 Hela 细胞等。得到的总的结论大致是 SOD 酶在生物体抗氧化作用上有一定的意义，但这种作用的充分发挥必须是在一定的时间、地点及和其他抗氧化酶类（至少包括过氧化氢酶和过氧化物酶类，参见表 1）协调配合的情况下才能实现。在正常的生理状态下，生物体抗氧化系统中的各种酶类是处于一种协调平衡的状态，随意改变这一系统中的某一酶类不但不会增强生物体的抗氧化能力，反而会导致原有状态的失衡，从而发生对生物体的伤害作用。

表 1　活性氧的主要代谢途径

Table 1　Main ways for metabolism of active oxygen specie

1. $O_2+e^- \xrightarrow{\text{多途径}} O_2^-$
（脂肪酸$+O_2 \xrightarrow{LOX}$氧化脂肪酸$+O_2^-$
2. $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SODs} H_2O_2 + O_2$
3. $H_2O_2 + O_2^- \xrightarrow{\text{Fe－螯合物}} \cdot OH + OH^- + O_2$
4. $H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{catalase} 2H_2O + O_2$
5. $H_2O_2 + SH_2 \xrightarrow{peroxidase} 2H_2O + S$

表 2　SOD 酶的部分性质

Table 2　Characteristics of SOD enzymes

SOD	存在部位	亚基数	分子量/亚基 ($\times 10^3$D)	金属原子数	KCN	H_2O_2
CuZnSOD	胞质、叶绿体	2	15－17	1Cu/Zn/分子	敏	敏
MnSOD	线粒体、原核生物	2，3 或 4	20－22.5	0.5－1/亚基	不敏	不敏
FeSOD	线粒体、原核生物	2 或 4	18－22	1－4/分子	不敏	敏

三、植物 SOD 酶研究概况

关于植物 SOD 的研究也有许多报道，但其内容大致可归纳为如下几个方面：①同工酶之鉴定与比较；②生化性质之研究，包括最适 pH 值、热稳定性、分子量大小、亚基数目、金属含量、在细胞内的分布、氨基酸组成和顺序、酶的四级结构等；③重要农作物、园艺作物对不良环境（低温、高光强、低 CO_2、环境污染、病虫侵害等）的抵抗与 SOD 酶活性的关系；④SOD 酶基因的核苷酸序列和转基因工作等。

研究所涉及的植物包括：①豌豆（CuZnSOD 同工酶之鉴定[4]；叶绿体 CuZuSOD cDNA 的克隆和定序[5]）；②番茄（胞质和叶绿体 CuZnSOD cDNA 的克隆和定序[6]）；③矮牵牛（叶绿体 CuZuSOD cDNA 的定序[7]）；④小麦（从种子中鉴定出一种 MnSOD 和两种 CuZuSODs[8]）；⑤大豆（种子中只含有 CuZnSOD 酶，同工酶带为 5－6 条[9]）；⑥橡胶（MnSOD cDNA 的克隆和定序[10]）；⑦烟草（见下述）；⑧玉米（见下述）；⑨水稻（两种

CuZnSOD cDNA 核苷酸序列的比较[11];CuZnSOD 基因组克隆的结构[12])。在这些植物中,以对烟草和玉米的 SOD 研究最清楚。前者为比利时 Universiteit Gent 的 Montagu 领导的小组所作[13]。到 1992 年为止,他们已获得了烟草中 CuZnSOD、MnSOD 和 FeSOD 的全部 cDNA 克隆,并获得了转 MnSOD 基因的烟草植株。玉米 SOD 研究为北卡州立大学遗传学系 John G. Scandalios 所领导的小组所作。他们的工作证明,据所测的近交系不同,玉米中的 SODs 有 4—5 种同工酶,这些同工酶的部分特性列于表 3。从该表中可以看出,SOD1、2、4 虽都为 CuZnSOD,但其存在部位是不同的,而且用它们各自制备的抗血清与其他 SOD 酶的交互反应性也不同。在其他许多生化性状上,这几种同工酶之间也都表现有相当的差异。到 1989 年止,玉米 CuZnSOD2、4、4A 和 MnSOD 的 cDNA 都已被克隆和定序,SOD2、SOD3、SOD4 和 SOD4A 的基因组克隆也已被分离(对玉米中过氧化氢酶的分子生物学比 SOD 的分子生物学研究还要更深入些)。Genomic DNA blots 表明,各个 SOD 酶的基因都以单拷贝或很少拷贝的形式存在于细胞核中,转录后再在 cytosolic ribosomes 上合成 SOD 酶或其前体多肽(带有一段 transit peptide),然后必要的话,再转移到目标细胞器中(如叶绿体和线粒体),并在那里得到进一步修饰而成为成熟的具活性的酶。玉米和烟草中 SOD 各同工酶生化性质的深入研究及其基因的克隆和定序等为今后进一步研究这些酶或其基因的表达与周围环境因子(包括病害)的相互关系提供了基础和手段。

表 3 玉米 SOD 酶的生化性质

Table 3 Biochemical properties of maize SODs

同工酶	SOD1	SOD2	SOD3	SOD4
胞内定位	叶绿体	细胞质	线粒体	细胞质
离子及含量(分子量)	2Cu—2Zn	2Cu—2Zn	4Mn	2Cu—2Zn
亚基	14.5	17.0	24.0	15.9
单酶	31—33	31—33	90	31—33
四级结构 T1/2(分钟)	二聚体	二聚体	四聚体	二聚体
55℃	稳定	7.9	稳定	7.1
0.5mmol/L H_2O_2	80	43	稳定	37
1mol/L DDC	稳定	8.4	稳定	9.6
相对活性 pH7.8	1.00	1.00	1.00	1.00
1mol/L KCN,pH10.0	0.058	0.093	1.095	0.067
pH10.0	3.13	11.34	1.160	10.56
糖含量(%)	<1.0	4.5	<1.0	2.0
专一性抗血清	SOD1	SOD2/4	SOD3	SOD2/4

四、活性氧和 SOD 酶与植物抗病性的相关

迄今,这方面的报道不是很多,从 80 年代初到现在总计数量不超过六七十篇,涉及的病害系统约 20 余种。这些文章多以阐述活性氧和 SOD 酶是否与植物抗病性相关这一现象为主,所得结论非正即反。由于对现象还无一定的结论,因此目前尚难谈到对问题本质的理解。为了叙述上的方便,本文将这些文章分为“有关”和“无关或待定”二部分来介绍。

1. 活性氧/SOD 酶参与植物的抗病反应

Zacheo 等人[14]研究了番茄抗感品种分别被 *Meloidogyne incognita* 侵染后 $O_2^{\cdot-}$/SODs 的变化。结果表明抗病品种接种后还原 NBT 和 Cyt. C 的能力均增强，而感病品种接种后，此种还原能力是下降的，并且此种增强或下降的幅度是随着接种量的增大而增大的。如在反应体系中加入 SOD 酶，则 NBT 和 Cyt. C 的还原量明显减少，说明 $O_2^{\cdot-}$ 确实是造成 NBT 和 Cyt. C 被还原的主要因素。对 SOD 酶活的测定结果表明，感病品种接种 5 天后伴随着 NBT 还原能力的下降(40—50%)，SOD 活性是上升的，最高可比未接种对照上升 65%。而在抗病品种中接种 5 天后伴随着 NBT 还原能力的上升(20—50%)，SOD 活性是下降的，最多可降 27%。进一步对抗感植株各部位中的 $O_2^{\cdot-}$ 和 SOD 水平的分析结果表明，在感病植株中接种线虫后 SOD 活性增加最多的部分是肿瘤组织(galled tissue)。同时 NBT 还原能力下降最多的也是该部位。和未接种对照相比在该部位中 formazan(NBT 的还原产物)的量约下降 3 倍。与此相似，在抗病品种 $O_2^{\cdot-}$/SODs 变化最强烈的地方也是寄主的受侵部位(necrotic area)。组织学观察更进一步证明，在用 NBT 处理过的番茄抗病品种的根系中，蓝色素(formazan)的积累往往只局限于线虫正在取食的细胞及其周围邻近的细胞中，而在已死的或其他细胞中无这种蓝色素的形成。同样的抗病品种的根系，如在用 NBT 处理前事先用 SOD 酶处理，并置于缺氧条件下，则也不能形成蓝色素。与抗病品种相反，在感病品种被线虫侵染后用 NBT 处理只能在细胞壁上形成一些非常淡的色素。所有这些证据都说明了 $O_2^{\cdot-}$/SODs 确实参与了番茄对根结线虫的抗病反应。在抗病品种中，线虫侵染后 SODs 活性降低，$O_2^{\cdot-}$ 水平升高，并由此可能会导致一系列的后果，如酶类的失活、脂质的过氧化、膜功能的丧失，直至最后细胞崩溃而表现为过敏性坏死反应。相反，在感病品种中，由于较高活性的 SOD 清除了 $O_2^{\cdot-}$，因而避免了组织的坏死，即不发生过敏性坏死反应，从而表现感病。

日本名古屋大学农学部的 Chai 和 Dlke[15]曾用 *Phytophthora infestens* O 小种的细胞壁组份(HWC)处理不含任何主效抗病基因的马铃薯品种"Irish Cobbler"的下部三片叶子，结果在处理后 1—7 天内上部叶片中的 $O_2^{\cdot-}$ 产生量明显增加，并且 SOD 酶和过氧化物酶(POX)活性也随之上升。如果在上述应激产生 $O_2^{\cdot-}$、SOD 和 POX 的叶子上接种 *P. infestans* 的游动孢子悬液，结果在处理 1—5 小时后 $O_2^{\cdot-}$ 的产生量又被进一步提高。和未用 HWC 诱导的对照植株相比，在用 HWC 处理的植株上病斑的数量显著减少，因而认为 $O_2^{\cdot-}$ 参与了 HWC 对马铃薯的诱导抗性。莫斯科大学马铃薯研究所的 Ivanova 等人[16]也发现在对照疫病抵抗和感染的马铃薯品种中，$O_2^{\cdot-}$ 产生的高峰时间是不同的。对于抗性品种 $O_2^{\cdot-}$ 产生的高峰时间是在接种后 4—6 小时，而感病品种则是在接种后 17—20。小时他们认为这一现象可用于马铃薯晚疫病抗病品种的筛选。

在水稻稻瘟病方面，以苏联的 Aver'yanov 为首的小组[17,18]和日本的 Sekizawa 为首的小组(1987)成果最丰。他们得出的结论大致如下：①用可见光照射处理 5 小时可抑制 *Pyricularia oryzae* 孢子的萌发和菌丝的生长。添加 SOD 酶可解除这种抑制，但添加过氧化氢酶解除效果不大，表明 $O_2^{\cdot-}$ 参与了光诱导的孢子萌发和生长的受抑；②水稻抗稻瘟病的重要机制之一是叶片中渗出的 $O_2^{\cdot-}$ 对 *P. oryzae* 有毒害作用，但如果 *P. oryzae* 孢子中存在黑色素(melanin)，则可消除这种毒害作用；③在抗病品种的叶片渗出物中加入

SOD、Cat、HO·清除剂、$O_2^{\cdot-}$ 猝灭剂可解除其对病菌的抑制作用；④活性氧也参与 *P. oryzae* 孢子萌发的自我抑制和其萌发液对其他微生物孢子萌发的抑制；⑤侵染能否成功与病菌的抗氧化酶系和寄主的抗侵染反应的互作有关，破坏或削弱病菌的抗氧化酶系将是今后防治稻瘟病的一条新思路。

对小麦条锈病，Chigrin[20]的研究结果表明，抗病品种接种 1－3 天后，POX、LOX、phospholipase C 和 LAH5 的活性显著上升，SOD 和 glutathione reductase 的活性表现下降，而在感病品种中接种以后 SOD 和 glutathione reductase 的活性表现显著上升。认为寄主材料的抗感病性取决于膜损伤因子（不饱和脂肪酸和酚羟酸的氧化产物）和寄主保护性酶类生成的相对速率。

Keppler 等[21]曾用化学发光法研究了烟草细胞悬浮液中加入不亲和菌（*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*，小麦的致病菌，可致烟草细胞的过敏性坏死）和亲和菌系（*P. s. syringae* B7，*Ps. s.* 致病株的 Tn5 插入突变株；*P. s. tabaci* 烟草的致病菌）后 $O_2^{\cdot-}$ 的变化。结果发现在接种后的 1 小时内所有的组合都出现 $O_2^{\cdot-}$ 和胞外 pH 的短暂升高（pH 升高被认为是 HR 的特征之一），但在 2－4 小时后，这种升高仅见于非亲和性组合中，而在亲和性组合中则开始逐步下降。

此外，在如下一些病害系统中也报道有活性氧参与植物的抗病性：*Phaseolus vulagris-Uromyecs phaseoli*[22]；*P. vulgaris-P. syringae* pv. *phaseolicola*[23]；豌豆-*Meloidogyne incognita*[24]；豌豆-烟草环斑病毒[25]；棉花-*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*[26]；玉米-*Bipolaris maydis*[27]……。

2. 活性氧/SOD 酶与植物的抗病反应无关或作用不明

尽管上面介绍了许多活性氧/SOD 酶与植物抗病性有关的报道，但也有许多事例证明活性氧/SOD 酶与抗病性并无关系或至少还不能确定。这种矛盾的结果有时甚至发生在以相同或相似的材料为研究对象的事例中。

Moreau 等[28]曾研究了许多激发子（elicitor）在诱发马铃薯块茎和叶片中植保素累积的过程中是否有 $O_2^{\cdot-}$ 和 SOD 酶的参与，结果表明游动孢子萌发液和花生四烯酸处理并不能导致还原性 Cyt. C 的增加；毛地黄皂苷和 $AgNO_3$ 处理虽可导致还原性 Cyt. C 生成量的增加，但加入 SOD 后并不能使其显著减少，说明这一过程中也无 $O_2^{\cdot-}$ 的参与。用另外三种脂肪酸（oleic acid，linoleic acid 和 eicosapantaenoicacid）所作的试验也得到了同样的结果，即在马铃薯植株内植保素诱发累积的过程中无 $O_2^{\cdot-}$ 和 SOD 酶的参与。

意大利的 Minardi 和 Mazzuchi[29]曾研究了烟草叶组织受 *P. syringae* Van Hall 侵染后 $O_2^{\cdot-}$ 的产生情况，结果表明在不亲和组合中接种后叶片中被 $O_2^{\cdot-}$ 特异性还原的 Cyt. C 的量并未增加；同时用 SOD 酶处理发生过敏性坏死的叶片也未能明显地减少 *P. syringae* 的死亡，说明在该系统中并未有 $O_2^{\cdot-}$ 的直接参与。

用 *Ophiostoma ulmi* 的弱毒株接种榆树可以阻止以后强毒株的侵染。R. J. Scheffer[30]曾就 SOD 和 peroxidase 是否参与了这一过程作了研究，结果没有观察到这两种酶和这一现象间的相关。

Jordan 和 Devay[31]对马铃薯亲和和不亲和组合中 $O_2^{\cdot-}$ 水平的测定结果表明，在亲和组合中 $O_2^{\cdot-}$ 产生量最大，不亲和组合中次之，健康未接种对照中最小。由于该结果和其他

许多人[14,15,21]的结果相矛盾，因此 Jordan 等认为对 $O_2^{\cdot-}$ 与马铃薯 HR 的关系需作进一步的研究。

总之，目前的许多研究报道表明在许多病害系统中并不存在活性氧/SOD 酶和抗病性之间的相关。这一点似乎与前面介绍的一些事例相矛盾。但笔者认为这应该是正常的。因为自然界中的病害数量是难以计数的，而每一种病害中都有其独特的抗病和致病机制。而且在一种病害中，植物的抗病性也往往是多途径、多手段抗性机制的综合。因此，具体到 $O_2^{\cdot-}$/SOD 酶也不可能是每一种病害都与其有关，即使有关，也可以有程度上的差异。至于在不同的病害系统中，其相关方式不同，笔者认为也应该是可以理解的。

五、结　束　语

生物的抗氧化系统是一个复杂的多酶体系。一般认为这一体系的重要生理功能之一是对外界不良的生物和非生物因子的刺激作出各种各样的反应，从而起到保护生物体免遭伤害的作用。目前，在这方面的研究可以说已达到了相当的水平。包括 SOD 和过氧化氢酶在内的许多氧化酶的基因已被克隆，甚至已被用来转化某些植物。在各种逆境因子刺激下，这些酶类基因的表达调控也已得到了部分的阐明[13,32]。在植物抗病性方面，六七十年代国内外都曾作过一些关于 POX 和 CAT 与植物抗病性相互关系的研究。另外，在许多场合下一些氧化酶类还常被和芳香族化合物的合成、乙烯的产生、木质素的累积等植物的抗病反应联系在一起。但是，应该承认这些研究工作都只是一些表面现象上的探讨，距离对问题本质上的全面的理解还很远。今后，随着分子生物学技术的不断发展及其向植物病理学领域的日益渗透，有关包括 SOD、POX 和 CAT 等在内的抗氧化酶类在植物抗病性中的作用必将被澄清。未来这方面的研究将很可能成为理解植物抗病性分子机制的一个很重要的突破口。

参　考　文　献

[1] McCord, J. M., Fridovich, I., Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. 1969, **244**: 6049.

[2] Haliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Free radicals in biology and medicine, Oxford: Clarendon Press, 1989.

[3] 方允中、李文杰，自由基与酶——基础理论及其在生物学和医学中的应用。北京：科学出版社，1989。

[4] Duke, V., Salin, L., Isoenzymes of cuprozinc superoxide dismutase from *Pisum sativum*. Phytochem. 1983, **22**: 2369－2373.

[5] Scioli, J. R., Zilinskas, B. A., Cloning and characterization of a cDNA encoding chloroplastic CuZn-superoxide dismutase from pea. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, **85**: 7661－7665.

[6] Perl-Treves, R. et al., Isolation of two cDNA clones from tomato containing two different superoxide dismutase sequences. Plant Mol. Biol. 1988, **11**: 609－623.

[7] Tepperman, J., Katayama, C., Dunsmuir, P., Cloning and nucleotide sequence of a petunia gene encoding a chloroplast localized superoxide dismutase. Plant Mol. Biol. 1988, **11**: 871－872.

[8] Beauchamp, C. O., Fridovich, I., Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. Biochemica et Biophysica Acta, 1973, **317**: 5－64.

[9] 王爱国等，大豆种子超氧化物歧化酶的研究。植物生理学报，1983, **9**(1): 77－84。

[10] Miao Zhonghe, Molecular cloning, characterization, and expression of cDNA and genomic clones encoding MnSOD from rubber (*Hevea brasiliensis*). PhD dissertation, Rutgers: the State Univ. of New Jersey, 1991.

[11] Sakamoto, A. et al., Nucleotide sequences of two cDNA clones encoding different Cu/Zn-superoxide dismutases expressed in developing rice seed (*Oryzae sativa* L.). Plant Mol. Biol. 1992, **19**: 323－7.

[12] Sakamoto, A. et al., Genomic structure of the gene for Cu/Zn-superoxide dismutase in rice. FEBS, 1992, **301**: 185－189.

[13] Bowler, C., Montagu, M. V., Inze, D., Superoxide dismutase and stress tolerance. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992, **43**: 83－116.

[14] Zacheo, G. Zacheo, T. B., Involvement of superoxide dismutase and superoxide radicals in the susceptibility and resistancce of tomato plants to *Meloidogyne incognita* attack. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1988, **32**: 313－322.

[15] Chai, H. B., Doke, N., Systemic activation of O_2^- generation reaction, superoxide dismutase, and peroxidase in potato plants in relation to induction of systemic resistance to *Phytophthora infestans*. Ann. of the Phytopathol. Soc. Jpn, 1987, **53**: 585－590.

[16] Ivanova, D. G. et al., Generation of active oxygen species in different types of interactions between potato plants and *Phytophthora infestans*. Fiziol. Rast. 1991, **32**: 281－289.

[17] Aver'yanov, A. A. et al., Fungitoxicity determined by active forms of oxygen in excretions of rice leaves. Fiziol. Rast. 1988, **35**(6): 1142－1151.

[18] Aver'yanov, A. A., Increased sensitivity of pigment mutants of *Pyricularia oryzae* to toxic excretion of rice leaves. Fiziol. Rast. 1989, **36**(6): 1088－1095.

[19] Sekizawa, Y., Haga. M., Hirabayashi, E. et al., Dynameic behavior of superoxide dismutase generation in rice leaf tissue infected with blast fungus and its regulation by some substances. Agric. Biol. Chem. 1987, **51**: 763－770.

[20] Chigrin, V. V., Oxidative, lipolytic and protective enzymes in the leaves of rust resistant and susceptible plants of wheat, Fiziologiya Rastenii, 1988, **35**: 1198－1208.

[21] Keppler, L. D., Baker, C. J. Atkinson, M. M., Active oxygen production during a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cells. Phytopathol. 1989, **79**: 974－978.

[22] Buonaurio. R., Torre, G. D., Montalbini., P., Soluble superoxide dismutase (SOD) in susceptible and resistant host-parasite complexes of *phaseolus vulgaris* and *Uromyces phaseoli*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1987, **31**: 173－184.

[23] Croft, K. P. C., Voisey, C. R., Slusarenko, A. J., Mechanism of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris*(L.) inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1990, **36**: 49－62.

[24] Ganguly, A. K., Dasgupta, D. R., Superoxide dismutase activity in resistant and susceptible cowpea cultivars inoculated with rootknot nematode, *Meloidogyne incognita*. Indian J. Nematol. 1988, **18**: 322－325.

[25] L-Moshaty, B., Idris, F., Study of plasma membrane in virus-infected cells. PhD Dissertation, Univ. of Missouri, 1988.

[26] 李　妙等，不同抗枯萎类型棉花品种超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性研究。华北农学报，1993，**8**(增刊)：199－122。

[27] 崔　洋等，玉米小斑病菌C小种毒素对玉米雄性不育系及其保持系超氧化物歧化酶及过氧化物酶活性的诱导。华北农学报，1992，**7**(1)：25－30。

[28] Moreau, R. A., Osman, S. F., The properties of reducing agents released by treatment of *Solanum tuberosum* with elicitors from *Phytophthora infestans*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1989, **35**: 1－10.

[29] Minardi, P., Mazzucchi, U., No evidence of direct superoxide anion effect in hypersensitive death of *Pseudomonas syringae* Van Hall in tobacco leaf tissue. J. Phytopathol. 1988, **122**: 351－358.

[30] Scheffer, R. J., Mechanisms involved in biological control of Dutch elm disease. J. Phytopathol. 1990, **130**: 265－276.

[31] Jordan, C. M., Devay, J. E., Lysosome disruption associated with hypersensitive reaction in the potato—*Phytophthora infestans* host parasite interaction. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1990, **36**: 221—236.

[32] Scandalios, J. G., Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. In: Advances in Genetics (J. G. Scandalios, eds.) Vol. 28. New York: Academic Press. 1990, 1—41.

SUPEROXIDE DISMUTASES AND PLANT DISEASE RESISTANCE

Li Shidong

Aerobic organisms are often suffering from the active oxygen species, which exist in several forms and can be converted into each other, mainly through the peroxidation of membrane lipids. Superoxide dismutases (SODs), classified into three types by their metal cofactors: the cupper/zinc, manganese, and iron forms, have been identified as some essential component in some organism's defence against this deleterious reaction. So far, the genes encoding the three types of SODs have been cloned and characterized from many organisms including plants. The physiological functions of the enzymes have also been partially elucidated by use of genetic engineering techniques. For their role in plant disease resistance, present researches are focused on confirming whether superoxide and SODs are related with the resistance. Some reports showed that the generation of superoxide was increased immediately after penetration of host cells by the incompatible race of pathogens but not by compatible one. The superoxide was therefore suggested as a causal factor in triggering hypersensitive reaction, as well as the following sequential resistance metabolism. At the same time, it was found that SOD activity increased during an incompatible reaction, and decreased, not changed or increased with a relatively small level during a compatible reaction, in comparison with uninfected controls. However, opposite results have also been documented, and in some pathosystems it was demonstrated that there were no cor relations between the changes of $O_2^{\cdot -}$/SODs and disease resistance. In addition, some researchers are trying to relate the $O_2^{\cdot -}$/SODs with induced resistance, but it is still far away from understanding the relationship deeply. As the development of genetic engineering techniques and its application in plant pathology, the roles of $O_2^{\cdot -}$ and each isozyme of SODs will be clarified further.

乙烯反应链中的植物生理和抗病防卫反应

张宪省

一、引　　言

乙烯是一种植物激素，在通常生理条件下以气体状态存在。现在已知几乎所有高等植物的器官、组织和细胞都具有产生乙烯的能力。此外，绝大多数真菌也能产生乙烯[1,2]。通常植物产生的乙烯量非常微小，但在某些发育阶段(如成熟、衰老)或当植物受到病原物的侵染时，乙烯的产生急剧增加[3]。乙烯对植物从种子萌发到成熟衰老所有的生长发育过程都起着调节作用。尽管早在19世纪中期人们已经认识到空气中的某种气体能改变植物的生长，但直到本世纪初才有俄国科学家 NelJubow[4]首先鉴别出影响豌豆黄化幼苗奇异生长、照明气中的活性物质是乙烯。紧接着 Cousin[5]发现当香蕉和柑桔果实一起运输时，柑桔果实产生的气体引起香蕉果实的成熟，由于健康的柑桔果实几乎不产生乙烯，所以肯定乙烯来自于受真菌感染的柑桔果实。以后、尤其是30年代随着研究的不断深入，发现乙烯不仅对果实而且对花卉、蔬菜成熟衰老均具强烈的促进作用，从而提出了乙烯是成熟激素的概念[3]。但由于植物体内乙烯的含量太低，又是气体，测定起来非常困难，限制了进一步深入研究。1959年 Burg[6]等第一次把气相色谱技术应用于乙烯的研究，使乙烯的测定灵敏度达到 ppb 级水平，从此乙烯的研究进入一个新阶段，研究其生理作用、生物合成、作用机理以及与果实、花卉成熟和贮藏有关的报告大幅度增加。其间1967年 Goeschl 等[7]在模拟豌豆幼苗出土时乙烯生成和作用的实验中，证实了乙烯对植物生长发育的调节作用，具有典型激素的性质，人们从而承认乙烯同生长素和其他激素一样是一种植物激素。

二、乙烯生物合成的途径

为了了解乙烯生物合成的正确途径，科学家们做了大量的研究工作。研究发现果实缺氧时乙烯生成停止，但当果实再转入空气中时，乙烯的产生会大量增加，甚至会超过一直处于空气中的果实。该现象说明在缺氧条件下果实内部积累了大量的乙烯生成前体物质，当转入空气中时它们迅速被氧化成乙烯[3]。1979年 Abams 和 Yang[8]比较苹果组织在空气和 N_2 中的蛋氨酸时，发现在空气中饲喂的放射性蛋氨酸被转化成乙烯，而在 N_2 中无乙烯的生成。利用 GC-MS 鉴别乙烯生成的前体为1-氨基环丙烷基羧酸(1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid，简称 ACC)。在有氧条件下，ACC 被组织迅速氧化成乙烯。至此乙烯的生物合成途径被定为：蛋氨酸(Met)→S-腺苷蛋氨酸(SAM)→1-氨基环丙烷基羧酸(ACC)→乙烯(C_2H_4)，这是高等植物体内乙烯生物合成的途径。由于乙烯是气体，一旦形成便迅速挥发，所以体内乙烯生成主要通过 ACC 合成和代谢进行调节，乙烯生成的限速步骤是 ACC 合成酶催化 SAM 转化为 ACC，而 ACC 转化为乙烯则是由 ACC 氧化酶又称乙烯形成酶(EFE)催化。

三、控制乙烯生物合成的基因

1. ACC 合成酶基因

在发现 ACC 是乙烯合成的直接前体后，随着研究的不断深入，又揭示出限制乙烯生物合成的酶是 ACC 合成酶。诱导乙烯产生的各种因子实质上是通过启动 ACC 合成酶的合成起作用。那么一个根本的问题是，不同的诱导因子可诱导不同的 ACC 合成酶基因表达，还是所有的诱导因子只启动同一个 ACC 合成酶基因表达。最早获得 ACC 合成酶基因的是 Sato 和 Theologis[9]。他们利用化学免疫法从密生西葫芦(Zucchini)的果实中分离出 ACC 合成酶基因，并获得该基因在大肠杆菌和酵母菌中表达的产物即 ACC 合成酶。随后，科学家们先后从许多植物中分离出合成酶基因，如番茄果实[10]、苹果果实[11]、冬西葫芦果实(Winter seqush)[12]、香石竹的花瓣等[13]。大量的研究工作证实了 ACC 合成酶是被一个多基因的家族编码[14]。例如，番茄的 ACC 合成酶至少被 6 个基因编码，其中两个只在果实成熟过程中表达[15,16]。在拟南芥、水稻、冬西葫芦等植物中，也有类似的现象，即不同的因子，包括发育信号、激素、环境刺激等均可启动不同的 ACC 合成酶基因表达[14]。

通过比较多种植物的 ACC 合成酶氨基酸顺序，发现它有 7 个保守区段。每个保守区段至少含有 8 个氨基酸残基。保守区段内，不同材料间 95%的氨基酸完全相同。ACC 合成酶的活动需要辅酶吡哆磷酸，第 5 个保守区段是酶活性部位中心，它与吡哆磷酸结合催化反应进行。此外，在 ACC 合成酶的 C 端(425－454 氨基酸残基)存在一段顺序易变区域，由于这些氨基酸顺序不保守，因此有人推测该区域与 ACC 合成酶的活动无直接联系[11]。

2. ACC 氧化酶基因

由于把 ACC 供给各种组织，除跃变前的果实外都能有效地转化为乙烯，表明一般组织中转化 ACC 为乙烯的 ACC 氧化酶是固有的，不是体内乙烯形成的限速步骤。ACC 转化为乙烯是需要氨的氧化反应，解偶联剂(DNP)以及自由基清除剂均能抑制乙烯生成。实验证实 ACC 氧化酶处于液泡膜的内表面(而 ACC 合成酶是可溶的)，该酶的活动依赖于膜的完整性，任何导致膜结构破坏的因素，如创伤，都会使其活性丧失[1]。编码 ACC 氧化酶的基因也是一个基因家族，如番茄至少有 3 个 ACC 氧化酶基因[17]，目前关于 ACC 氧化酶基因表达调控的研究资料较少。

四、乙烯生物合成的调节

乙烯的产生受各种发育和环境因子调控。植物在生长发育的某些时期产生乙烯，如萌发、果实成熟、叶片脱落和花衰老。此外，乙烯的产生也能被各种外界因子诱导，如机械损伤，各种环境协迫及某些化学物质。植物产生的乙烯反过来又调控许多生理和生化过程。

1. 果实成熟和花衰老的调节

由于跃变型果实在成熟前有一个乙烯产生高峰，所以一般认为乙烯在果实成熟过程中起着非常重要的作用。香蕉和番茄的果实在呼吸高峰前 ACC 的含量非常低，但在成熟开始时 ACC 的产生猛烈增加[1]。在鳄梨果实的呼吸高峰期，ACC 的含量猛增到 45n mol/g，然后下降到 5n mol/g，以后又增加，同时乙烯的产生下降，并保持较低的水平，说明在过度成熟的果实中，ACC 转化成乙烯的能力受到抑制[1]。呼吸高峰前的苹果果实用外源 ACC 处理后，乙烯的产生增加很少，而在呼吸高峰期可增加到上百倍，表明呼吸高峰前的果实不仅将 SAM 转化成 ACC 的能力有限，而且将 ACC 转化成乙烯的能力也是有限的[1]。某些花的衰老，如香石竹和牵牛的花，在许多方面与果实成熟相似。花衰老也伴随着乙烯合成和呼吸高峰。外源乙烯可诱导花的衰老。刚切下的花乙烯的产生和 ACC 的含量都非常低，但当花衰老开始时乙烯和 ACC 的合成都迅速增加[18,19]。

2. 生长素和乙烯调控的乙烯合成

生长素可诱导乙烯产生。许多情况下生长素引起的反应，实质上是由生长素诱导乙烯产生，然后再由乙烯引起生物反应。在营养组织内，乙烯产生的速率与内部游离生长素的水平有关。高速率乙烯的产生往往与高水平的生长素有关[20]。由于蛋氨酸转化成 SAM 和 ACC 转化成乙烯都不需要 IAA，说明 IAA 诱导的乙烯产生实质上是启动了 ACC 合成酶基因的表达[21]。用 IAA 处理的组织，撤去 IAA 后，乙烯的产生便迅速下降，表明 ACC 合成酶极不稳定，易分解[1]。在成熟果实和其他的衰老组织中，乙烯具有自动催化作用，即当这些组织暴露给乙烯时，乙烯会大量生成。由于最初的乙烯处理和以后的乙烯大量生成的时间间隔依赖于组织的成熟度和敏感性，因此乙烯自动催化的机理是相当复杂的，也可能是间接的，在呼吸跃变前的果实中，可能存在成熟抑制剂，当用乙烯处理这些果实时抑制剂被摧毁，乙烯启动了成熟过程[1]。

3. 胁迫诱导的乙烯产生

几乎所有的胁迫都可诱导乙烯产生。胁迫包括机械损伤、病原物侵染、高温、低温、干旱、水淹、化学物质等。胁迫乙烯是由生活组织产生，当胁迫严重时，细胞死亡，乙烯的产生也随之停止。胁迫诱导的乙烯产生通常在协迫后 10－30 分钟开始，几个小时后达到高峰[1]。控制胁迫乙烯产生的关键步骤是 SAM 转化为 ACC，表明胁迫诱导的乙烯产生启动了 ACC 合成酶基因的转录和翻译。当应用 AVG（ACC 合成酶抑制剂）处理后，ACC 和胁迫乙烯的产生均受到抑制。应用蛋白质合成抑制剂预处理后，胁迫诱导的 ACC 和乙烯的产生也受到抑制[22-24]。

除上述各种因子外，光和 CO_2 也能促进或抑制乙烯的产生。此外，还存在各种抑制物质可抑制乙烯的合成，本文不再详细讨论。

五、乙烯对植物生长发育的调控

植物在生长发育的某些阶段产生大量的乙烯，这些乙烯对植物的生长发育起着十分

重要的调节作用。乙烯的主要生理功能是促进成熟和衰老。为了研究内源乙烯对植物生长发育的调节作用，有人将从成熟的番茄果实中分离出的 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶反义基因导入番茄植株，通过抑制内源乙烯的产生，观察其对表现型的影响。这种转基因植株的成熟番茄果实，97%以上的乙烯产生受到抑制。果实采后在常规条件下贮存 4 个月后，颜色为橙色，但不变红变软，也无香味；生理测定结果证实亦无呼吸高峰。但当这些反义果实用外源乙烯处理后，诱导了呼吸高峰的产生，并且其表现型与自然成熟的果实相比，在质地、颜色、香味和硬度方面均无明显差异[25,26]，揭示出乙烯控制呼吸高峰的产生及与此有关的生化代谢，如果实变软、变红和香味的产生。Klee 等[27]从一种生长在土壤中的细菌内克隆出 ACC 脱氨基酶基因。ACC 脱氨基酶可将乙烯生成的前体物 ACC 转化为 α-丁酮酸，以作为细菌生长的氮源。他们将 ACC 脱氨基酶基因与花椰菜花叶病毒的 35S 启动子连在一起，导入植株，致使果实成熟期间乙烯的产生受到严重抑制，果实成熟推迟，然而乙烯产生受阻并未导致转基因植株营养器官生长异常。内源乙烯对植株营养器官的生长影响并不明显。最近还有人应用番茄突变体对乙烯的作用进行了研究。该突变体对乙烯反应不敏感。不同于正常的番茄植株，突变体的花从不脱落，花瓣和花药也不脱落，并且子房发育并未伴随着花瓣衰老[28]。将 ACC 合成酶基因导入番茄植株，使其过度表达，产生大量的乙烯，实验结果亦支持上述结论。

六、植物病害和乙烯

植物感染各种病原物后，尤其是在退绿或坏死症状出现时，产生大量乙烯[29]。许多真菌和细菌本身也产生乙烯[2]，而感染病毒的植物形成乙烯仅仅是植物的一种反应。病毒引起植物反应产生的乙烯完全来自蛋氨酸，与正常组织进行的生物合成途径完全一样。

用烟草疫霉(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)处理烟草细胞，在处理后几分钟 ACC 合成酶和 ACC 的含量开始上升，同时伴随着乙烯产生。此外，SAM 合成酶的活性也增加，说明病原物启动了从蛋氨酸到乙烯的合成途径[30]。进一步的工作发现用病原菌感染无乙烯产生的番茄果实(基因工程技术创造的无乙烯产生果实)，果实发病的进程明显减慢，乙烯的产生也较少[30]，表明乙烯与植物的抗病防卫反应密切相关。其他的一些研究工作也显示出：在感染部位早期形成大量乙烯与抵御各种病原物的抗性反应相关，如有几种植物诱导几丁质酶的产生；甜瓜感染炭疽病时增强细胞壁中富含羟脯氨酸的糖蛋白合成；感染 TMV 的烟草减缓病毒的蔓延等。在烟草中，乙烯的出现与病毒引起过氧化物酶活性增加和新出现蛋白质(PRP)有关，这种蛋白质的合成与植株获得抗性发育关系密切。因为没有感染的植株存在 PRP-mRNA，但不能翻译，乙烯可使 mRNA 进行翻译[29]。总的来说，植物病理学家把乙烯作为诱发植物抗病防卫反应的一种信号，试图明确它参与激发的诱导抗病性的各个环节、并明确植物接受诱导的靶基因及其区段。目前已建立起的大框架是：植物在受某种信号刺激后诱发乙烯的产生，此种乙烯有可能作为二级信使参与对包括植物细胞壁木质化、富羟糖蛋白、PRP、植物保卫素等功能分子的进一步诱导；与 H_2O_2 作为二级信使的情况有所不同，乙烯对这些功能分子及植物最终的抗、感表现，有的是正效应，有的是负作用，因病害的不同而异。

七、结　　语

近年来有关乙烯生物合成的途径、生物合成调节方面已做了大量研究工作，取得了一些突破性进展，但有关乙烯与植物抗病之间的机理研究，工作尚少，需进一步深入研究。植物感病后产生的乙烯，必须启动和调节许多基因的表达，其中某些基因的表达与植物的抗病性关系密切，利用分子生物学技术克隆这些基因，并进一步研究其表达的调控，对于我们认识病害诱导乙烯产生的抗病机制是十分重要的。

参 考 文 献

[1] Yang, S. F., Hoeffman, N. E., Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 1984, **35**: 155－189.

[2] Ilag, L., Curtis, R. W., Production of ethylene by fungi. Science, 1968, **199**: 1357－1358.

[3] 刘　恩，乙烯生物合成及其调节研究的进展。植物生理学通讯，1986(1)：60－66。

[4] Neljubow, D., Ueber die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer. Plfanzen Beih. Bot. Zentralbl. 1901, **10**: 128－239.

[5] Cousins, H. H., Agricultural experiments. Citrus. Ann. Rep. Dep. Agric. 1910, Jamacia, p. 7.

[6] Burg, S. P., Thimann, K. V., The physiology of ethylene formation in apples. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1959, **45**: 335－344.

[7] Goeschl. J. D., Pratt, H. K., Bonner, B. A., An effect of light on the production of ethylene and the growth of plumular portion of etiolated pea seedlings. Plant Physiol. 1967, **42**: 1077－1080.

[8] Adams, D. O., Yang, S. F., Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Proc. Natl. Sci. USA, 1979, **76**: 170－174.

[9] Sato, T., Theolgis A., Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. Proc. Natl. Sci. USA, 1989: 6621－6625.

[10] Van Der Straeten D., Van Wiemeersch L., Goodman, H. M., Van Montagu, M., Cloning and sequences of two different cDNAs encoding 1-aminocyclo-propane-1-carboxylate synthase in tomato. Proc. Ntl. Sci. USA, 1990, **87**: 4859－4863.

[11] Dong, J. G., Kim, W. T., Yip. W. K., Thompson, G. A. Bennett, A. B., Yang, S. F., Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. Planta, 1991, **185**: 38－45.

[12] Nakajima, N., Mori, H., Yamazaki, K., Imaseki, H, Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induced by tissue wounding. Plant Cell Physiol. 1990, **31**: 1016－1021.

[13] Park, K. Y., Drory, A., Woodson, W. R., Molecular cloning of an 1-aminocy-clopropane-1-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals. Plant Mol. Biol. 1992, **18**: 377－386.

[14] Theologis, A., One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. Cell, 1992, **70**: 181－184.

[15] Olson, D. C., White, J. A., Edelman, L., Harkins, R. N., Kende, H., Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. Proc. Ntl. Sci. USA, 1991, **88**: 5340－5344.

[16] Rottman, W. E., Peter, G. F., Oeller, P. W., Keller, J. A., Shen, N. F., Nagy, B. P., Taylor, L. P., Campbell, A. D., Theologis, A, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. J. Mol. Biol. 1991, **222**: 937－961.

[17] Pech, J. C. , Latche, A. , Balague, C. , Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1992, Abstract 13.
[18] Mayak, S. , Legge, R. L. , Thomoson, J. E. , Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylate acid by microsomal membranes from senescing carnation flowers. Planta, 1981, **153**: 49—55.
[19] Mor, Y. , Spiegelstein, H. , Halevy, A. H. , Inhibition of ethylene biosynthesis in carnation petals by cytokinin. Plant Physiol. 1983, **71**: 541—546.
[20] Abeles, F. B. , Ethylene in plant biology. New York: Academic, 1973, p. 302.
[21] Yu, Y. B. , Adams, D. O. , Yang, S. F. , Regulation of auxin-induced ethylene production in mung bean hypocotyls. Plant Physiol. 1979, **63**: 589—590.
[22] Boller, T. , Kende, H. , Regulation of wound ethylene synthesis in plants. Nature, 1980, **286**: 259—260.
[23] Kende, H. , Boller, T. , Wound ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in ripening tomato fruit. Planta, 1981, **151**: 476—481.
[24] Yu, Y. B. , Yang, S. F. , Biosynthesis of wound ethylene. Plant Physiol. 1980, **66**: 281—285.
[25] Oeller, P. W. , Lu, M. , Taylor, L. P. , Pike, D. A. , Thegelogis, A. , Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science, 1991, **254**: 437—439.
[26] Hamilton, A. J. Lycett, G. W. , Grierson, D. , Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. Nature, 1990, **346**: 284—287.
[27] Klee, H. J. , Harford, M. B. , Kretzmer, K. A. , Barry, G. F. , Kishore, G. M. , Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. Plant Cell, 1991, **3**: 1187—1193.
[28] Lanahan, M. B. , Yen, H. , Giovannoni, J. J. , Klee, H. J. , The *never rippe* mutation blocks ethylene perception in tomato. Plant Cell, 1994, **6**: 521—530.
[29] 胡文玉等译，植物衰老过程和调控。沈阳：辽宁科学技术出版社，1990，p38。
[30] Pech, J. C. , Latche, A. , Balague, G. Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1992, Abstract 49, 57.

ETHYLENE-CONDITIONED RESPONSE SEQUENCES: ITS RELATION WITH PLANT DEFENCE AGAINST DISEASES

Zhang Xiansheng

Plant hormone ethylene plays an important role in plant development and plant defense against diseases. In this paper, we focus on introducing the ethylene biosynthesis and the genes of ACC synthase and ACC oxidase which are two key enzymes in the ethylene biosynthesis. Also, the regulation of ethylene biosynthesis by main developmental signals (such as fruit ripenning and flower senescence) and environmental factors (such as endogenous and exogenous auxin and ethylene, and stresses) are discussed. Furthermore, the effects of the ethylene on the plant growth and development, and the molecular mechanism of pathogenesis-related ethylene with function of elicitation plant defence against diseases are analysed. As concluding remarks, we take a suggestion to the further researches on the mechanisms of the pathogenesis-related ethylene to elicit the plant defence.

甜蛋白 thaumatin 及其基因的研究进展

刘长征

植物甜蛋白是存在于某些植物体内的具有甜味生物活性的蛋白质。由于它们能和味觉受体进行特异性结合，因而具有很高的甜度[1]。目前至少已分离到 4 种植物甜蛋白：thaumatin[1-4]，monellin[5]，miraculin[6]，curculin[7]，其中以对 thaumatin 研究的最为深入。

Thaumatin 是当今已知最甜的物质，以摩尔计它要比蔗糖甜 10^5 倍，以重量计它比蔗糖甜 10^3 倍。其甜味最低阈值是 3×10^{-8}，为已知阈值最低的甜味物质[1]。同时，thaumatin 还具有使其他甜味物质降低阈值的作用。

Thaumatin 是从西非热带植物 *Thaumatococcus daniellii*(Benth)果实的假种皮中分离到的。在果实成熟期，thaumatin 蛋白约占假种皮干重的 50%。*T. daniellii* 是竹芋科的灌木植物，最早由英国人 Daniellii 报道[8]。该植物的各部分都具有一定的使用价值，其中最具吸引力的是其果实的假种皮。几个世纪以来当地人一直把它当作甜味剂加入食品和饮料中。目前，Tate & Lyle 公司已有从 *T. daniellii* 中提取到的 thaumatin 蛋白产品出售，其商品名：Talin. Talin，一方面，作为可被糖尿病患者食用的甜味剂，是蔗糖的最佳替代品；另一方面，它还是一种理想的饲料添加剂。由于 *T. danielii* 只有在热带环境中才能正常生长，致使有关 thaumatin 蛋白的产品价格都非常昂贵[9]。

一、thaumatin 蛋白的生化性质和结构

所有 thaumatin 蛋白都由一个多基因的基因家族编码[10]。目前，已分离到 7 种 thaumatin 蛋白，它们是 thaumatin Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ[11]，thaumatin b、c[3]和 thaumatin A、B[4]。前 5 种是通过离子交换层析法从 *T. daniellii* 果实假种皮中分离的，后 2 种则是从 *T. daniellii* 叶片中得到的。其中，以 thaumatin Ⅰ、Ⅱ 的含量最丰。thaumatin 蛋白均为碱性蛋白质，由一条含有 207 个氨基酸残基的肽链组成；分子量在 22kDa 左右，等电点约 12.0。其氨基酸序列几乎完全一致，如 thaumatin Ⅰ 和 thaumatin Ⅱ 之间仅有 5 个保守的氨基酸残基的不同[12]。而且氨基酸残基的替换不会引起电荷的变化，这表明 thaumatin 是一个蛋白质家族。

对 thaumatin Ⅰ 进行的一系列结构分析发现，其结构中含有 8 个二硫键，分别在 9－204，55－66，71－77，121－193，126－177，134－149，145－148，159－164 氨基酸残基之间[13]。Van der Wel 等利用圆二色性技术和理论计算研究了 thaumatin Ⅰ 蛋白的高级结构后，将其结构划分为两大区域，每个区域各有 4 个二硫键。整个结构中以 β-折叠和 β-转折为主，另外间有少量的 β-螺旋。其中从 93 号到 120 号氨基酸残基是一段柔韧性较高的序列，与另外一种植物甜蛋白 monellin 的氨基酸序列进行比较，发现这段含 28 个残基的

序列与 monellin 上对应的序列具有一定的同源性。上述结果提示我们：该序列或许同 thaumatin 蛋白与味觉受体特异性结合有关，甚至该序列可能就是 thaumatin 蛋白的甜味之所在[14,15]。次年，De Vos 等利用 X 射线衍射技术又对 thaumatin Ⅰ 的高级结构进行研究，发现氨基酸残基 94—96，100—102，104—106，118—120，128—130 都可以在另一种植物甜蛋白 monellin 中找到相应的序列，而且这 5 段序列均呈对外开放。他们在研究的基础上，将 thaumatin Ⅰ 蛋白划分为 3 个区域。第Ⅰ区中以扁平的 β 折叠筒结构为主，这种结构在蛋白质分子中是普遍存在的。第Ⅱ、Ⅲ区中则以由二硫链支撑的 β-骨架和小环结构为主，类似的结构可以在蛇毒素、玉米凝集素、细胞毒素中发现。而这几种蛋白质都具有和适当受体进行结合的特点。因此，De Vos 认为：第Ⅱ、Ⅲ区在与味觉受体的特异结合中起着极其重要的作用[16]。

另外，Van der Wel 还发现 8 个二硫键中任何一个断裂都会造成 thaumatin 蛋白甜味生物活性的丧失。

二、thaumatin 基因

1982 年 Edens 等[17]构建了 *T. daniellii* 果实假种皮的 cDNA 文库，从中筛选到一个编码 thaumatin Ⅱ 蛋白的前体蛋白的基因。该基因编码区为 705bp，3' 端非编码区有约 200bp 的 poly A 信号序列。为了进一步的研究工作，此基因被插入适当的载体而构建成质粒 pUR-528 和 pUR-538。不久，Adrianus 又建立了 *T. daniellii* 叶片的基因文库，并以 thaumatin Ⅱ cDNA 为探针分离到 5 个核基因，这些基因中都含有 2 个小的内含子；对这 5 个基因进一步的酶切分析以及杂交实验都表明它们属于一个多基因家族[10]。

将从 thaumatin Ⅱ 前体的 cDNA 序列推测出的氨基酸序列[17]与 thaumatin Ⅰ 和 thaumatin A、B 的氨基酸序列[4,18]进行比较发现，thaumatin Ⅱ 前体的 cDNA 基因的阅读框架内 5' 端有 66 个核苷酸编码含 22 个氨基酸残基的信号肽序列，3' 端有 18 个核苷酸编码含 6 个氨基酸残基的酸性"尾巴"序列。而在 thaumatin Ⅰ，A、B 蛋白中却无信号肽序列和酸性"尾巴"序列。这表明两段序列在肽链翻译后的加工过程中被剪切掉了[17]。亲水性的信号肽在协助蛋白质跨越核膜时起引导作用，同时它对蛋白质还具有一种保护作用[19]。酸性"尾巴"在蛋白质分子的定位中起作用，这种定位对于蛋白质分子的保护，运输以及功能的实现都具有意义[20]。同时由于 thaumatin 蛋白在部分还原时，具有蛋白酶、酰胺酶、脂酶的活性，如果没有定位作用使它们分布在一定区域内，细胞本身将受到损害[21]。

三、thaumatin 基因在微生物中的表达

作为一种经济效益较高的商品，多年来，人们一直在寻找 thaumatin 蛋白的大量、低廉的生产方法。

在非热带环境下 *T. daniellii* 无法长出正常的果实。英国 Reading 大学曾在温室环境下试种 *T. daniellii*，却没有成功，后来虽曾诱导出单性果实，但其假种皮没有甜味[3]。*T. daniellii* 引种的困难，使得科学家转而利用生物技术，使 thaumatin 基因在微生物中表

达，以获得具甜味的 thaumatin 蛋白。研究情况见表 1。

表 1 thaumatin 基因在部分微生物中的表达

Table 1. Expression of thaumatin genes in microorganisms

微生物	启动子	信号肽的编码序列	thaumatin 蛋白的编码序列	酸性"尾巴"的编码序列	thaumatin 蛋白的表达量	thaumatin 蛋白的甜味	参考文献	备注
E. Coli	lac/trp	有	全部	有	500 个/细胞	无	17	*E. coli* 不能对 thaumatin 前体蛋白进行后加工
B. subtilis	amy	无	剃掉 10bp	无	lmg/L	无	22	
S. lividans	gal	无	剃掉 10bp	无	0.2mg/L	无	23	
A. oryzae	GPD	有	全部	有		无	24	A. oryzae 不能对 thaumatin 前体蛋白进行后加工

lac：乳糖合成酶基因启动子　　trp：色氨酸启动子
amy：α-淀粉酶启动子　　gal：β-半乳糖苷酶启动子
GPD：甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子

Edens 等将 thaumatin Ⅱ 前体的基因分别进行 5' 端 66bp 和 3' 端 18bp 的缺失，并将这 2 个基因以及完整的 thaumatin Ⅱ 前体的基因分别置于 GAPDH(3-磷酸甘油醛脱氢酶)启动子调控下，转化酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)[25]。结果发现：5' 端缺失的基因几乎没有表达出 thaumatin Ⅰ蛋白，这可能是因为翻译出 thaumatin Ⅱ 蛋白由于没有信号肽序列的引导和保护，而被酵母细胞降解。3' 端缺失的基因的表达量为 1500 个拷贝/细胞，其产物是信号肽被切除的成熟 thaumatin 蛋白。无缺失的 thaumatin Ⅱ 前体的基因表达量是 3000 个成熟的 thaumatin Ⅱ 蛋白分子/细胞。虽然这个表达量并不很高，但可以肯定的是，酵母菌能对 thaumatin Ⅱ 前体蛋白进行完整和准确的后加工。由上述结果我们可以看出，信号肽序列不仅在 thaumatin 蛋白的合成、运输、存在中扮演重要角色，而且也与 thaumatin 前体蛋白的后加工过程密切相关。另外有观点认为：酸性"尾巴"在 thaumatin 蛋白的高级结构形成中有重要作用[23]。尽管酵母菌中表达的 thaumatin 蛋白具有与植物 thaumatin 蛋白相同的序列，但前者却无后者的甜味。为使 thaumatin 基因能在酵母菌中高效表达，Lee 等在合成 thaumatin Ⅰ 和 thaumatin A、B 3 个基因时，采用了酵母优先密码子(yeast-preferred codons)，并进一步在编码基因的 5' 端加上了起始密码子 ATG，3' 端加上了 2 个连续的终止密码子 TAATGA。然后将这 3 个基因分别置于酵母 PGK(3-磷酸甘油酸激酶)强启动子及终止子的调控之下转化酵母菌 AH22。聚丙烯酰胺凝胶电泳显示：在酵母细胞中表达了相当高水平的 thaumatin 蛋白。由于信号肽序列的缺失使蛋白难以跨越胞膜，绝大部分的 thaumatin 蛋白仍然保留在细胞内，而且仅仅是存在于细胞中的不可溶部分。酵母内部的还原环境(reducing environment)使得 thaumatin 蛋白无法形成二硫键，因而这些产物也没有显示出甜味生物活性。奇怪的是所合成的 3 个 thaumatin 基因都没有信号肽序列和酸性"尾巴"序列，但在酵母中却实现了高水平的表达，约占酵母不溶蛋白的 20%。这虽与 Edens 的结果相异，却与人干扰素基因[26]、牛凝乳

原基因[27]等在酵母中的表达情况相同。

由上可见，thaumatin 基因始终没有在微生物中表达出具有甜味生物活性的蛋白质，究其原因，可能是①转录水平较低；②翻译产物不能进行修饰加工，难以形成正常的高级结构；③不利的微生物细胞环境使之难以合成、运输，存在并积累到显示甜味生物活性的量。

四、thaumatin 基因在转基因植物中的表达

Witty 等[28]在 New Zealand Journal of Crop Hortic Sci. 上以简报的形式报道：利用根癌土壤杆菌 A4T 和穿梭质粒 pWIT2（其上包含 CaMV35S 启动子 thaumatin Ⅱ cDNA、瘤基因的 3' 端终止区）转化马铃薯（*Solanum tuberosum* L.），获得再生植株。Southern 和 Western 杂交证实基因已整合到植物基因组中，并表达出成熟的 thaumatin Ⅱ 蛋白。甜味实验表明叶片、茎、毛根均有甜味。但有关该工作的详细报道尚未见到。

北京大学杨美珠等[29]也曾把带有甜蛋白基因和胭脂碱合成酶标记基因的 Ti 质粒导入马铃薯，获得大量的再生植株。叶片抗性检测和 nopaline 检测推断，外源甜蛋白基因已进行入马铃薯基因组。

Penarrbia 等[30]利用 E8-monellin 和 CaMV35S-monellin 嵌合基因转化番茄，发现不同启动子调控下的 monellin 基因，在转基因植株的不同器官得到表达。因而他认为采用适当的器官专一性启动子，对于甜蛋白基因的高效表达至关重要。考虑到上述情况，刘长征等构建了在块根专一性启动子 sporamin 调控下 thaumatin Ⅱ cDNA 的表达质粒，并转化马铃薯，已得到了再生植株，进一步的检测工作正在进行。

目前，有关 thaumatin Ⅱ 基因在转基因植物中的研究报道还比较少，仅见的几篇基本上只限于得到再生植株，而对于有无甜味生物活性却无明确的说明。但无论如何 thaumatin 基因在植物中的表达要容易一些，并且也给人更大的希望。

五、与植物抗病性诱导有关的类似 thaumatin 的蛋白质（TLP）

植物诱导抗病性是指由各种生物、非生物因子刺激、胁迫或应力诱发的植物抗病害防御，即这些刺激、胁迫可以使植物由原来对某种病害感病变为程度不等的抗病[39]。80 年代以来，人们已把诱导抗病性从上述笼统的、功能上的概念分解和对应为不同的防卫反应机制加以研究，表明它的发生是按由不同防卫反应机制组成的层次性（orderliness）和这些反应发生时间有先有后的时序性（timeliness）发生的。其中，由转录水平上的基因控制的新的、或有明显量的变化的蛋白质的积累参与了重要作用，这类蛋白质被称为病程相关蛋白（pathogenesis-related protein，PRP）。

PRP 与 TLP 同属于植物诱导型、并作为一个大类在植物生命中担负不同功能的蛋白质（inducible proteins）[32,34-38]，它们在这一大类诱导型蛋白质中的"亲近关系"是较早为人们所注意的。这种"亲近关系"首先可以从蛋白质分子大小、血清学反应关系、同源性、生化定性（如几丁质酶或 β-1，3-葡聚糖酶）及功能加以考察。根据这些情况，Fritig 等[40]把 PRP 分成 1—5（包括 1，2a，2b，3，4，5a，5b）5 个组，其中 5a 组为类 thaumatin（TLP），分子

量 24kDa，有碱性和酸性的两类。这类 TLP 的发生情况是[41]：①带 nc(对烟草花叶病毒 TMV 过敏反应基因的隐性基因)基因的香料烟(*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi)受 TMV 侵染后产生的 R-minor 和 R-major 酸性蛋白质，即在 Frigit 的分类中的 5a 组的 PR-R 和 PR-S，二者按 2∶3 的比例积累，同时还有相同分子量的碱性蛋白质产生；②烟草细胞受盐胁迫产生的 osmotin Ⅰ 和 osmotin Ⅱ，也是按 2∶3 发生；二者的 N 端氨基酸顺序有 62%分别与 PR-R 和 PR-S 同源；③番茄受盐诱导产生的碱性蛋白质 NP24，根据其 cDNA 克隆推测，NP24 与上述烟草的 osmotin 有 90%以上的顺序同源；④上述烟草的酸性和碱性 TLP 及番茄 NP24 均与 *T. daniellii* 的 thaumatin 有约 60%的序列同源；⑤玉米中具有抑制胰蛋白酶和 α-淀粉酶双重功能的抑制子 AP-1(amylase/protase inhibitor)(不属上述 5a 组的 PR-R 或 PR-S)与 thaumatin 显示 52%的氨基酸同源顺序，而上述烟草的 TLP 和番茄的 NP24 与 AP-Ⅰ 也有约 60%的同源性。

PRP 与 thaumatin“亲近关系”的更主要的表现在于它们形成过程和序列功能的相似：①都有一个从前体到成熟蛋白质的过程；②大多有 N 端信号顺序及与在植物组织中分布(定位)有关的 C 端扩展顺序(上述烟草和番茄的 TLP 无信号肽)；③都存在特定保守区段；④它们的基因都有针对不同刺激发生反应的靶顺序(target sequences，TS)。对以上种种，其他作者已有详述。

比 thaumatin 本身在植物生命中功能不明的情况更甚，上述 TLP 是 PRP 中功能最不明确的一类诱导型蛋白质。但有几个思路可以遵循：①董汉松总结并推测认为 PRP 有 5 种可能的功能，其中一种是攻击或抑制病原物，上述 TLP 与 AP-1 的关系暗示，不同 TLP 可能有抑制病原物某些酶(可能包括致病酶)的作用；②在蛋白质氨基酸顺序上的同源、尤其在相应的编码基因 DNA 顺序上的同源，有 target sequences 的设想和前人已积累的少数结果为证据，说明植物基因组 DNA 序列上有一个控制对特定诱导作出反应并激活(或调控)功能基因的“开关”，董汉松认为这是关于植物诱导抗病性研究最有诱惑力的思路，对此，可参见董汉松、徐文联、张学君的有关论述。

六、结　　语

关于 thaumatin 蛋白在植物生命中的功能将是一个十分有意义的课题，把这一点与关于 PRP 和 TLP 关系的思路联系起来，可知要得到明确的结论需要相当一段时间的探讨。目前关于 thaumatin 基因的研究更多地集中于它的表达调控，包括它作为外源基因在转基因植物中的“瞬间表达”；同时，以经济目的和功用目标为主的力图使转基因植物或微生物产生出有甜味的 thaumatin 的努力，也取决于关于基因调控的研究。另外，thaumatin 基因在基因工程技术中作为一种工具的作用已引起注意，已有人把它作为标记基因用在植物基因工程中[31]。

参 考 文 献

[1] Cusak, M., Pierpoint, W. S., Similarities between sweet protein thaumatin and a pathogenesis-related protein from tobacco. Phytochem. 1986. **27**: 3817－3821.

[2] Cornelissen, B. J. C., van Hvijsduijnen, R. A. M. H., Bol, J. F. A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. Nature, 1986, **321**: 531—532.

[3] Higginbotham, J. D., Hough, C. A. M. Useful taste properties of amino acids and proteins, In Sensory Properties of Amino Aids of Food (Birth, G. C. ed.). Elsevier Appl. Sci. Pres, 1977, pp. 129—149.

[4] Lee, J. H., Welckmann, R. K., Koduri, R. K. et al. Expression of synthetic thaumatin genes in yeast. Biochem. 1988, **27**: 5101—5107.

[5] Morris, J. A., Martenson, R., Deibler G., Cagan, R. H. Characterization of monellin, a protein that tastes sweet. Chem. 1973, **248**: 534—539.

[6] Brouwer, J. N., Van der Wel, H., Francke A., Henning, G. J. Miraculin, the sweetness-inducing protein from miracle fruit. Nature, 1968, **220**: 373—374.

[7] Kitamura, R., Kiyomitsu, Y., Matsuo R., Yamamoto T. Chem. Senses, 1989, **14**: 319.

[8] Daniell, W. F. Katemfe, of the miraculous fruit of Soudon. Pharm. J. 1985. **14**: 158—159.

[9] Witty, M. Thaumatin Ⅱ—a palatability protein. TIBTCH, 1990, **8**: 113—116.

[10] Ledeboer, M. L., Theo Verrips, T. C., Dekker, B. M. M. Cloning of the natural gene for the sweet-tasting plant protein thaumatin. Gene, 1984, **30**: 23—32.

[11] Van der Wel, H., Loeve, K. Isolation and characterization of thaumatin Ⅰ and Ⅱ, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus* daniellii. Eur. J. Biochem. 1972, **31**: 221—225.

[12] Stintzi, A. T., Heitz, S., Kauffmann, M., Fritig, B. Identification of a basic pathogenesis-related, thaumatin-like protein of virus-infected tobaccos, osmotin. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1991, **38**: 137—146.

[13] Van der Wel, H., Iyengar, R. B., Van Brounwershaven, J., Van Wassenaar, P. D., Bel, G. Eur. J. Biochem. 1984, **144**: 41—45.

[14] Van der Wel, H. Trends Biochem. Sci. 1980, **5**: 122—123.

[15] Van der Wel, H. Chem. Ind. 1983, 19—22.

[16] De Vos, A. M., Hatada M., Van Der Wel, H., Krabbendam, H., Peerdeman, A. F., Kim, S.-H. Three-dimensional structure of thaumatin I, an intensely sweet protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 1985, **88**: 1406—1409.

[17] Edens, L., Heslinga, L., Klok, R., Ledeboer, A. M., Matt, J., Toonen, M. Y., Visser, C., Verrips C. T. Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *E. coil*. Gene, 1982, **18**: 1—12.

[18] Iyengar, K. B., Smits, P., van der Uderaa, F., Van der Wel H., Brouwershaven, B. V., Ravestein, R., Richters, G., van Wassenaar, P. D. The complete amino acid sequence of the sweet protein thaumatin Ⅰ. Eur. J. Biochem. 1979, **96**: 193—104.

[19] Bloel, G., Dobbersteln, B. Transfer of proteins across membranes. J. Cell Biol. 1975, **1788**: 193—198.

[20] Adeli, K., Altosaar, I. Compartmentalization of seed reserve proteins. FEBS, 1985, **1788**: 193—198.

[21] Illingworth, C., Larson G., Hellekant, G. Biotechnol. Lett. 1988, **10**: 587—592.

[22] Van Der Wel, H., Bel, W. J. Eur. J. Bioch. 1980, **104**: 413—418.

[23] Illingworth, J. J. Ind. Microbiol. 1989, **4**: 37—42.

[24] Lycett, G. W., Delaumey, A. J., Gatehouse, J. A., Gilroy, J., Dcroy, R. R. Sequence for preprovicilin. Nucl. Aci. Res. 1983, **11**: 2367—2380.

[25] Edens, L., Bom, I., Ledeboer, A. N, Maat, J., Toonen, M. Y., Visser, C., Verrips, C. T. Synthesis and processing of the plant protein thaumatin in yeast. Cell, 1984, **37**: 629—633.

[26] Hitzeman, R. A., Leung, D. W., Perry, L. J., Kohr, W. J., Kohr, H. L., Levine, H. L., Gooddel, D. V. Secretion of human interferons by yeast. Science, 1983, **219**: 620—625.

[27] Mellor, J., Dobson, M. J., Roberts, N. A., Tuite, M. F., Emtage, J. S., Whites, S., Lowe, P. A., Patel, T., Kingsan, A. J. Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 1983, **24**: 1—14.

[28] Witty, M. Preprothaumatin Ⅱ is processed to biological activity in *Solanum tuberosum* L. Biotech. Lett. 1990, **12**: 131—136.

[29] 杨美珠、潘乃遂、陈章良，高效马铃薯遗传转化体系的建立及甜蛋白基因的导入。植物学报，1992，**34**：31－36。
[30] Penarrubia, L., Kim, R., Giovannoni, J., Kim, S.-H., Fischer, R. L. Production of the sweet protein monellin in transgenic plants. Biotechnology, 1992, **10**: 561－563.
[31] Witty, M. Thaumatin Ⅱ: a simple marker gene for use in plants. Nucl. Aci. Res. 1989, **17**: 3312.
[32] Ben, J. C., Rob, C., van Uiksduijnen, A. M. H., Bol, J. F. A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. Nature, 1986, **321**: 531－532.
[33] Richardson, M., Valdes-Rodriguez, S., Blanco-Labra, A. A possible function for thaumatin and a TMV-induced protein suggested by homology to a maize inhibitor. Nature, 1987, **327**: 432－434.
[34] Vigers, A. J., Wiedemann, S., Roberts, W. K., Legrand, M., Selitrennikoff, C. P., Fritig, B. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. Plant Science, 1992, **83**: 155－161.
[35] Vigers, A. J., Roberts, W. K., Selitrennikoff, C. P. A new family of plant antifungal proteins. Mol. Plant-Microbe Interact. 1991, **4**: 315－323.
[36] Hejgaard, J., Svendsen I. Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. FEBS Lett. 1991, **291**: 127－131.
[37] Pierpoint, W. S., Jackson P. J., Evans, R. M. The presence of a thaumatin-like protein, a chitinase and a glucanase among the pathogenesis-related proteins of potato. Physiol. Mol. Plant Pathol., 1990, **36**: 325－338.
[38] Luc, R., Arro, M., Hoebeke, J. Immunological evidence of thaumatin-like proteins during tobacco floral differentiation. Plant Physiol (BETHESDA), 1992, **98**: 337－342.
[39] 章汉松，植物诱导抗性的机制和应用前景。植物抗性生理研究（赵可夫主编），济南：山东科学技术出版社，1992，193－201。
[40] Frigit, B., Rouster, J., Kauffmann, S. et al. Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions, NATO ASI Ser. H: Cell Biol. 36: 161－168. Vien: Springer-Verlag, 1989.
[41] Bol, J. F., Linthorst, J. M., Cornelissen, B. J. C. Plant pathogenenesis-realted proteins indueed by virus infection. Annu. Rev. Phytopathol. 1990, **28**: 113－138.

ADVANCES IN STUDIES ON MOLECULAR BIOLOGY OF THAUMATIN

Liu Changzheng

Thaumatin is a sweet-tasting plant protein, which can be isolated from the fruits and leaves of *Thaumatococcus danielli* Benth, a West African plant. The sweetness of thaumatin is long lasting and about 10^5 times sweeter than sucrose on a molar basis. There are at least seven different forms of thaumatin. All of them consist of a single polypeptide chain with 207 amino acid residues. The mature proteins contain 8 disulfide bonds. Sequence analysis of cDNA indicates that thaumatin Ⅱ is initially translated as a precursor form, preprothaumatin, with both a 22 amino acid amino-terminal secretion signal and an acidic 6 amino acid carboxy-terminal extension.

Because expressiones of the cloned thaumatin genes were failure in microorganisms such as *E. coli*, *B. subtilis*, *S. lividans* and A. *oryzae*, some synthetic thaumatin genes containing yeast-favoured codons were constructed and introduced into *S. cerevisiae*. Although expressed at high levels, none of the thaumatins was biologically active (sweet).

On the other hand, the expression of thaumatin genes in higher plants showed a promising future. The thaumatin gene was introduced into the higher plant *Solanum tuberosum* cvs using the hairy root transformation technique and the blind taste tests indicated a high biological activity of thaumatin in transgenic plants.

The biological function of thaumation in plants remains undetermined. However, some findings suggest that it may play an important role in response to wounding or infection of pathogens.

植物诱导抗病性的进化论和遗传学基础

董汉松　刘爱新

一、绪　　言

植物诱导抗病性的发生总体上依赖于植物各类基因的激活，包括与抗病性有直接关系的基因，如植物保卫素合成途径中不同酶的DNA编码序列，也有起源上看来主要是植物生命因子、在抗病性诱发(elicitation)过程中被赋予抗病防卫意义的基因，如有些病程相关蛋白(PRP)和富羟糖蛋白(HRGP)等的基因。这是近年不少植物病理学家重新谈论植物-微生物共同进化的主要论题：从具体的防卫功能因子控制基因的分工、在染色体上近簇排列、在近缘物种中的相似性等现象，可以想象出植物-微生物互作的宏观进化历程。

植物-病原物互作是这个历程的历史阶段性结果，相对来说，基因对基因关系只是横向考察植物-微生物关系的一个视点，它对植物-病原物互作和植物抗病性是一条统领全局的规律，而对前者只是互作关系的因子之一。如Bol等[1]和De Wit[2]所界定，基因对基因关系中的每对基因都包含着植物与病原物双方间的适应与敌对，归纳为非寄主抗性、非亲和的寄主抗性的控制基因都可以从植物-微生物互作的进化中找到原因，病原物和非病原微生物携带非功能*avr*基因的现象指示了一种进化时序和进化的基因贮备库。以上印象综合到一块就是：植物-微生物共同进化在使一部分微生物成为病原物的同时，也使植物基因组中的贮备成员按两种机制获得对病原物的抵抗能力，一种是组成型抗性，包括非寄主抗性和非亲和的寄主抗性，它们在受到病原物初侵染时就能表达；一种是诱导抗性，需要先行刺激活化才能表达，而这种可诱导的表达也是植物-微生物共同进化赋予的能力

以下讨论是先用共同进化的观点考察基因对基因关系，然后是关于包括在植物诱导抗病性中的基因对基因互作如何被启动，很难按顺序使用分子植物病理学的有关术语，所以在此先行给出。

(1)植物抗病相关基因：包括抗病基因(R)、防卫反应基因(*ds*)，前者的产物是效应分子，识别病原物的无毒基因(*avr*)或其产物并由此启动*ds*表达；*ds*的产物或是功能分子，或是功能分子和功能事件形成中的关键酶[1-3]。

(2)病原物致病相关基因：包括毒性基因(*vir*)、无毒基因(*avr*)和决定寄主范围的基因(*hrd*)[14]。*vir*间接编码致病因子如细胞壁降解酶、毒素等；*avr*主要担负引发非亲和寄主的过敏反应(HR)与对亲和寄主的致病性；*hrd*的功能顾名思义，实际上包括几类基因，有病原细菌的HR与致病基因(*hrp*)、根瘤菌的所谓竞争能力(competitiveness)基因及寄主专化性致瘤基因(*hsn*)等，有些*avr*也具有决定寄主范围的功能。

二、植物抗病性和病原物致病性的共同进化

共同进化是由微观进化积累成宏观进化而导致植物-病原物现阶段特定互作关系形成的历程,前者是在双方敌对与适应的过程中发生的一些小的基因变异,在某个给定的、现阶段的植物-病原物互作体系中常可以得到进化时序和程度的指示;后者是由这些小的变异积累成的、足以导致一种根本性行为(如病原物在寄主上建立侵染关系的能力和寄主植物抗病类型)产生的变异组合或大的基因变异,通常只能从染色体(或质粒等)基因图谱的比较、微观变异的分析来考察。说明这种关系的一个方便的例子是大肠杆菌与沙门氏菌从一个共同祖先进化为两个种的情况,为了获得具体印象,读者可先参阅本书有关篇目(梁元存等:"富羟糖蛋白")。

1. 宏观进化的结果

此结果是形成特定的植物-病原物互作关系和植物的不同抗病机制,所以我们感到只需对前人给定的一些术语进行介绍,就可以获得总体印象。

(1) 抗病类型:以下 3 种类型看来可以作为同位术语来理解。

1) 非寄主抗性:为某一类群病原物在某一类群植物上不表现可见的致病作用这一现象而界定的术语,病原物缺少与非寄主植物互作的一整套因子或其中某个关键因子,Hadgwiger 称之为"强烈的细胞不亲和"机制[3]。例如,如果微生物或病原物缺乏产生细胞壁降解酶的能力,那么它试图在植物上建立寄生关系的第一关就被卡住,更不用说下一步的活动。当来自非寄主的有关基因得到转化表达时,它可以编码从接触识别到互作各阶段关系的产物,表明非寄主抗性也是由特定基因控制、不同生化因子发挥作用的过程;只不过这些基因不必按时序全部表达或根本不表达,因为病原物不能给予它的非寄主一种持续的刺激信号;在病理学研究层次上,至少需设立一个寄主组合与一个非寄主组合,否则无法了解非寄主抗性是由哪些因子参与了作用。从共同进化看,非寄主抗性的机制或者是因为病原物与植物接触的频率低,或者是因为这种病原物(微生物)经常容易得到能够繁衍生存的条件,众多植物都可被作为非寄主的腐生微生物的情况,便是一个很好的说明。

2) 非亲和抗性:也常叫小种专化性抗性,是一个凡谈抗病性必涉及的概念,界定为 R 基因对 *avr* 基因互作的结果或过程[4],基因互作的细胞学反应中显示出明显的共同进化时序或程度关系。

3) 诱导抗性:非自然发生的由 R 基因编码的效应分子启动防卫反应基因(*ds*)表达并参与抗病反应的现象。这种抗性不表现为可遗传的性状,但当植物预先接受刺激时,基因的表达和参与抗病反应的功能因子与非亲和抗性大致相同。从共同进化的观点看,病原物与寄主的关系处在有亲和与非亲和性分化的前一个历程,很可能就是非亲和抗性的前时期;预先、人工施加诱导处理的作用是缩短了这一进程[5]。

(2) 互作的层次:按 McIntosh[6]的说法,抗病性是与最高程度的亲和性互作相比时,任何水平的非亲和性,这是一种试验考察的方法,同时指明抗病机制是由植物-病原物互作给予的,而不是植物单方面的特性。以下术语都是从这个基本点出发,但它们之间不是同位概念。

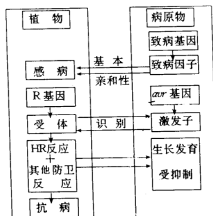


图1　植物-病原真菌互作的一个模式[2]

1）基本亲和性(basic compatibility)：一个微生物群体在一种(species，生物种)植物的任何成员上以寄生方式成功地繁殖和持续繁衍的能力[7]，它需要微生物具备一套克服寄主抗病性的手段或其中的关键环节(图1)。这对病原物来说，在共同进化上是一种"适可而止"的高度，它需要具备致病因子来克服植物抗病性而获得营养，又不能杀死植物[8,9]。相应地，基本非亲和性(basic incompatibility)就是缺少基本亲和性[4]。这一对术语是无法进行试验考察的，而所谓专化性的非亲和性实际上可以看作对基本非亲和性的定量评价。

2）互作的源缘分化：Gabriel 和 Rolfe [4]为了他们讨论的方便，界定了3个术语，由于离子通道防卫模式是在这些界定下展开讨论的，此处亦加介绍。同缘互作(homologous interaction)指一种试验结果，在一种植物与一种微生物双方至少某些成员间表现的基本亲和性。异缘互作(heterologous interaction)是试验观察到的一种基本非亲和性，由一种植物的所有成员与一种微生物或其致病变种或式样种的所有成员之间互作表现出来。专化性的非亲和性(specific incompatibility)指在某个亲缘互作中微生物寄生性繁殖的量(效率)与该互作体系最高效率相比减弱的程度。

3）寄主种的专化性(host-species specificity)：这是针对病原物来说的，指一种病原物只能在一种或固定的少数几种植物上、而不能在另外的植物上寄生和致病的现象，最早在豆科植物-根瘤菌中[10]发现，后来发现也适用于植物病原物[11]。根瘤菌这种专化性的控制基因叫 *hsn*(寄主专化性致瘤基因)，对植物病原物来说，决定基本亲和性(bc)之外的所有致病相关基因就是"种的专化性基因(*ssp*)"，bc 基因在病原物的许多种、属、甚至科中都可以是共同的，而 *ssp* 只存在于一定范围的病原物种中。例如 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 的 *nod*FE，控制该根瘤菌对白苜蓿和红苜蓿的"寄主种的专化性"致病性，同时还是豌豆的无毒基因[12]；许多植物病原细菌的无毒基因(*avr*)也具有这种双重功能[13,14]。

2. 致病性与抗病性共同进化的表现

无论是病原物的致病相关基因还是植物的抗病相关基因，都有按功能在染色体上近簇排列和序列相似(同源性)的现象，序列同源本身就是基因共同起源的一个指示，而近簇则有利于功能的协调和应激变异，也是同一种病原物演化出不同的变种、小种或致病型及同一种植物演化出不同的品种或抗病反应型(如 HR)的基础，更是植物-病原物互作的亲和性分化的基础，还是植物抗病性诱导中相关基因分工负责、对不同信号作出反应的基础。但下面我们只简略归纳负责具体致病相关和抗病相关的基因所表现的共同进化，不打算对每种谈到的基因展开叙述。我们还撇开那些众所周知的关于共同进化的论证和事例，例如 Vanderplank[15,16]及 Bull 和 Slater[19]所论述的，因为这些论述和事例与下面将谈到的不同，不仅被广泛注意到，而且已经形成了共识。

(1) 在病原物致病相关基因上的表现：何晨阳、王金生[14]评述了病原物与致病性相关的 3 类基因，除对致病性和寄主专化性起决定作用的毒性基因(*vir*)和寄主范围决定基因(*hrd*)[18]外，无毒基因(*avr*)是一个数目很大的类群，在多种病原细菌和真菌中得到众多克隆和功能研究[12,13,19-21]。以前人们注重的是 *avr* 控制对亲和寄主的致病性与对非亲和寄主的 HR 诱导这一双重功能，对它们在进化上的意义只是刚刚被注意到。

1) 作为共同进化的基因库：这是针对 *avr* 易于变异和非功能性 *avr* 的存在来说的。这类基因很容易发生突变，估计在 *Pseudomonas graminis* 和 *Xanthomonas vesicatoria* 中的突变频率各为每世代 8.3×10^{-6}和 4×10^{-4}次[19]，但突变大多不影响含这种基因的病原物的致病性和引发 HR 的能力；考虑到回复突变的现象也在微生物中普遍发生[23]，这种易于突变可能有利于保护功能性 *avr*、甚至与 *avr* 近簇的其他基因不受进化压力的冲击，也就是在适应寄主抵抗不良因子和有关的生存胁迫方面保持功能稳定。

非功能性 *avr* 是指那些不表现特定功能的 *avr* 基因，包括突变后没有发现对应的毒性基因位点和不改变病原物原有的相应功能、以及克隆转化后也不表现特定功能的一类 *avr*。因此，Gabriel 等[4]把 *avr* 的存在称作"没有来由的现象(Avirulence is generally a gratuitous phenotype)"。但是，如果把上述易变性和非功能性 *avr* 的广泛存在从另一个视点考虑，它们可能还有作为共同进化上的基因库的作用。反过来说更易于理解：谁也不能断定在共同进化的若干时期以后，这些非功能性的 *avr* 不会获得特定功能，正如迄今无人能知道现已具有对亲和寄主致病与引发非亲和寄主 HR 这一双重功能的 *avr* 在共同进化的若干时期以前，是否具有这种功能。

2) 本源上，病理功能可能是从生物功能派生的：人们注重到 *avr* 不仅是致病性和 HR 引发的决定因子[11]，还与植物的其他生理功能有关。例如，*X. campestris* pv. *malvacearum* 无毒基因 *avr*b6 的自发突变，可以引起该细菌在寄主植物上吸水能力的降低；*X. c.* pv. *vesicatoria* 用 Tn5 插入后，*avr*Bs2 的突变影响病菌在感病寄主体内生长的能力。Gabriel 等[4]认为 *avr* 更可能有助于细菌适应生存环境。进一步的设想是：*avr* 在起源上是病原物生命所需的因子，它的病理功能是在共同进化中派生出来的，不过，这是一个相当武断的推论。

但是，病原物大量携带所谓非功能性 *avs* 而这些基因并没有在进化中消失这一事实[4]，说明这些基因肯定担负尚未被人知的其他功能。无论是微生物还是其它高等生物，

总是以最省能量和负担的形式与另外的生物或环境发生联系，这在许多核外遗传因子上已得到很好的证实。例如，植物的线粒体基因，具有专化性地控制对真菌毒素反应的功能；质粒在许多病原细菌、尤其是 *Agrobacterium tumefaciens* 中担负不可缺少的病理功能，近20年来对这种核外遗传载体的研究逐步证明，以前被认为毫无生命意义的许多序列其实都担负营养、抗逆、抗化学物质、抗抗生素、保证在微生物区系中的竞争能力等多种功能[23]。对非功能性 *avr*，情况可能也是这样，这一点已被 De Wit[2]等注意到。

3）通过 *avr* 共同进化的轨迹：De Wit 提出一种富有启发的假设，认为 *avr* 除可能具有病理功能以外的其他功能，在共同进化上已经作为植物-病原物互作特定状态形成的基因源基础，人们由此可以了解通过这类基因共同进化的图景。最直接的机制是病原物完全失去 *avr*，逃避寄主识别而成功侵染寄主[5,24]；或者把 *avr* 突变成非功能性位点而达到同样的"目的"，位点非功能化可以通过转座子的插入或（和）切离[25,26]完成，也可以通过更细微的变异、甚至密码子或一个核苷酸的替代实现[20]，有的 *avr* 序列中可重复到 17.5 次的同源顺序[27]可以保证 *avr* 即使发生更大的变异也能保持功能稳定。

人们很早就注意到 HR 类型的互作中在植物对非亲和细菌的识别和固定与对亲和菌株的"温和反应"[28]之间，存在不少中间或过渡类型，董汉松[5,29]指出这是代表植物-细菌共同进化的一种缩微和指示。现已获得的基因分析结果提供了更有力的证据，对此，De Wit[2]给予了如下总结。

avr 基因存在不同程度的专化性。有些 *avr* 为某些病原物的某一或少数小种或致病变种所独有，如 *P. syringae* pv. *glycinea* 的 *avrA*、*avrB* 和 *avrC*，*X. c.* pv. *vesicatoria* 的 *avrBs1*。有些无毒基因如 *X. c.* pv. *v.* 的 *avrBs2*、*avrBs3*，*P. s.* pv. *tomato* 的 *avrD*，与其他小种或致病变种中功能性或非功能性的同源位点相对应。后一种情况明显地反映出共同进化关系，在共同进化过程中，*P. s.* 大豆致病变种（*glycinea*）的 *avrD* 可以突变为非功能性位点，从而逃避被大豆 R 基因识别，而番茄致病变种的 *avrD* 仍保持功能，被大豆 R 基因产物识别并引发自身的被限制直至死亡[29]。在非亲和寄主上引发 HR 与对亲和寄主致病的专化性，是由 *avr* 基因的重复顺序及重复单元在基因序列中的位置决定的，这两方面的改变可以引起细菌寄主范围（包括致病和引发 HR）的变化[27]。

类似的景象也显示在病原真菌中。*Magnaporthe grisea* 是水稻和许多杂草的病原菌，来自非寄主含羞草的分离物含独有的无毒基因 *Avr-Co39*、*Avr-M201* 及 *Avr-YAMO*，带这些基因的菌株是水稻的非病原菌；Health（1991）[18]认为，*M. grisea* 之所以成为水稻的病原菌，可能是因为在进化中失掉了这些无毒基因。因此，De Wit[2]指出，非寄主抗性除了因为对应的非病原物缺少特定致病因子外，拥有大量无毒基因也可能是一个重要因素。

（2）在植物致病相关基因上的表现　R-*avr* 基因互作自然是植物-微生物长期共同进化的一种高度，对此也已成为共识。我们关注的是由 R 基因或 R-*avr* 产物识别启动的 *ds* 基因所表现的共同进化轨迹。PRP 和 HRGP 基因是很好的例子：①它们的近簇（或组成所谓基因家族）排列、序列保守性或同源性、序列重复性、尤其是内含子序列中的重复性，指示了这些基因与病原物致病相关基因的类似特性所具有的相同的进化意义；②基因分子组织和功能分区、职能上的分工负责，尤其是基因靶序（TS），指示了植物长期接受特定刺激，包括病原物侵染、非亲和信号及可以引导次级信使传导到接受终端（TS）的一级激发子的刺激，从而形成的稳定功能；③根据前人的研究，我们推论了包括 PRP 和 HRGP 在

内的植物防卫反应功能因子在起源和进化上的大致景象。对上述的论述和例证，可参阅本书有关篇目(王少华等:病程相关蛋白诱导发生的分子生物学;梁元存等:富羟糖蛋白及其抗病防卫功能)。

三、基因对基因关系与抗病性诱导

植物-病原物互作是把互作双方作为一个整体来考察、了解抗病与致病机制，其遗传学立足点就是基因对基因关系;植物诱导抗病性的发生实质上是互作性质转变的过程，由基因对基因关系按不同层次表达而实现。

1. 历史简介

表 1 是根据 Ellingboe[30]及 Gabriel 和 Rolfe[4]的综述整理的，我们注重的是 3 个方面:①染病体(aegricorpus)的概念是互作概念的最早表述方式;②分子生物学意义上的基因对基因概念的 3 个要点是经过表 1 所指示的研究主线发展起来的，表所指的第 5 阶段之后接续了关于基因对基因关系运作(从表达调控到编码分子抗病功能的发挥)的几个模型，尤其是离子通道防卫模式;③Vanderplank 关于水平、垂直抗性的学说及与此有关的植病体系(pathosystem)的理论，在实践上产生了、而且现在仍有广泛影响，但它们在理论上与以上两方面有很大冲突，关键是这种冲突影响了(着)抗病育种的成功与否。

2. 与植物抗病性诱导有关的基因对基因互作

表 1 另外给出的一个众所周知的结论是:基因对基因关系适用于各种互作体系。近几年来，基因对基因关系得到了新的界定或发展[2,31-33]:显性和隐性的 R 与 *avr* 单基因互作遵循原来意义上的 R-*avr* 互作关系;在由两对基因参与互作的体系中，植物-病原物基因互作关系被解释为寄主 R 基因与病原物 *vir* 或 *avr* 基因的非等位基因间的相互影响，即双方相应的显性上位抑制基因的抑制作用可分别使寄主 R 和病原物 *vir* 或 *avr* 基因失去相应功能，这种互作关系是可以推导出来的[4];而在由两对以上基因参与互作的体系中，互作的运作被认为是许多微效基因对按基因对基因关系发生的主基因或单基因间的互作发生基因添加影响的过程，这种互作被解释成水平抗生发生的机制[34](上述所谓“冲突”似乎走向一致)。植物诱导抗病性的发生从植物 *ds* 基因表达和病原物激发子的基因控制看，大都是一种多基因互作。从植物一方看，各种抗病防卫功能因子都是多基因控制的，如 PRP 基因有 PR-1 到 PR-5 基因家族;当然，严格地说这不是 R-*avr* 基因互作的范围，但病原物由多种 *avr* 参与对公认的激发子的合成控制，除基因抑制外，可能还包括基因添加的作用[2];另有一个很好的例子，就是在菜豆的 HRGP 基因中已发现了至少 3 种抑制子。

在植物病理学概念中，来自病原物或(和)寄主植物的激发子被认为通过直接参与互作而诱导植物的抗病性。激发子-受体分子互作模式是考察这种抗病性诱发机制所依据的基本模型，Scholtens-Toma 等[31]在这个基本模型的基础上提出 4 种变型。我们注意的仍是基因对基因关系方面的信息和证据。

第一种:*avr* 与 R 产物直接作用。以莴苣与霜霉菌(Bettuce-*Bremia lactcae*)的互作体系为代表，由病原物的 18 个单显性 *avr* 对寄主的 18 个单显性 R 基因。寄主的所有 R 基

因组成一个基因组，是同一条染色体上 4 个连锁基因组中的一个[35]。病菌的 *avr* 以显性方式遗传，但有些 *avr* 在调控上受显性上位抑制基因抑制，对 *avr*5 的这种上位抑制基因已得到鉴定[2]。带 *avr* 基因的菌株在带 R 基因的品种上可以引发 HR，但一系列精心设计的试验都没有发现激发子，*avr* 的一级产物也未得到鉴定。Scholtens-Toma 等[3]因此认为这可能表明 R-*avr* 互作是直接的基因互作，但很难设想它不需要起码的一级产物。

表 1　植物-病原物基因对基因互作概念的发展[4,30]

Table 1　Development of gene-for-gene concept

阶段	学说首创(或首次研究)	研究者(学说首倡人)	文献
1. 跨纪阶段	①发现植物抗病遗传(小麦对锈菌)	Farrer, 1898	GF 42
	②研究证明小麦抗锈病遗传：观察到杂交遗传和 F_2 代分离，提出小麦抗锈由单隐性基因(孟氏)控制	Biffen, 1905	E5
2. 世纪头 20 年	①证实病原物种内存在基因变异：*Phaseolis vulgare-Collectotrichun lindemuthianum*	Barrus, 1911	E4
	②提出病原物生物型(biologic form)和生理小种(physiological race)的概念：禾谷作物(植物)-*Puccinia*	Stakman & Piemeisel, 1917	GF 147
3. 20—30 年代	①发现新抗源、克服生理小种的抗性	McFadden, 1930	E31
	②建立孟德尔规律在真菌、植物、动物遗传中的一般适用性	Craigie, 1931	E10
	③把抗病基因与产物相联：提出植物的抗病性取决于抗菌物质(toxin)	Walker, 1923; 1924	E41 E42
	④认为病原物新的毒性小种或微生物致病变种的产生在于克服了植物的 toxin	Link & Walker, 1933	E25
4. 40—50 年代	①基因对基因学说：亚麻锈菌体系	Flor, 1946; 1947	E16 E17
	②怀疑基因对基因学说的一般适用性：认为它只适合寄主专化的互作体系	Black, 1952 Toxopeus, 1956	E6 E39
5. 60—70 年代	①证明基因对基因关系的普遍适用性	Bagga & Boone, 1960; 1968	E16 E17
	②"水平"和"垂直"抗性理论诞生：	Van der Plank, 1963	E40
	它在抗病育种上产生了深刻影响(根据"水平"抗性不符合基因对基因关系的假设)	Loegering & Harmon, 1969	E28
	③基因对基因关系的重新证明：既适于单基因也适于多基因；所谓"水平抗性"只是多基因控制的抗病性受环境干扰的结果	Ellingboe, 1972; 1976	GF35 E14
	④提出染病体(aegricorpus)的概念	Loegering, 1963	E27

注：本表据 Ellingboe[30]和 Gabriel & Rolfe[4]整理，带 E 和 GF 的文献号分别指前者和后者参考文献的序号。

第二种：激发子/抑制-受体分子互作，以马铃薯-*Phytophthora infestans* 体系为代表。实际上，在这个互作体系中还存在激发子-抑制子/增强子-受体分子 4 因子互作的情况。

第三种：激发子-受体互作，即只有激发子、无抑制子，以菜豆-*Collectotrichum lindemuthianum* 体系为代表，激发子是糖蛋白，由 α 菌株产生。

第四种：*avr* 基因一级产物作为激发子的激发子-受体分子互作，唯一的例子就是番茄与皮层下寄生的霜霉菌 *Cladosporium fulvum* 之间的互作体系，是到目前为止获得符合基因对基因关系的 *avr* 产物的第一例[2,14]。在此体系中，寄主可被分为一系列近等基因系，对病菌的不同小种有截然不同的反应[31]，从近等基因系中已获得 Cf2、Cf4、Cf5 和 Cf9 几个克隆。叶霉菌参与互作中的蛋白质有两类，一类是为建立基本亲和性所需的蛋白质[36]，从亲和互作组合的寄主体内发现的一种 14kDa 的多肽，被认为可能是具有这种功能的蛋白质[37]。另一类是小种专化性的激发子蛋白质，由 *avr* 基因编码[2]。上面所说的获得 *avr* 一级产物的第一例就是由 *avr*9 编码的一个 3kDa 的蛋白质[31]。它由含 63 个氨基酸的前体转化而成，成熟的激发子蛋白质含 28[2]或 27[31]个氨基酸，这段功能序列成熟前位于前体的 C 端[38]。含 *avr*9 基因而能合成这种激发子的小种可以在含 Cf9 基因的寄主上引发 HR；而无 *avr*9 的小种不具这种 HR 引发功能（文献[2]表 2，文献[31]表 3），它们的基因组也不存在与 *avr*9 同源的序列[2]。以上一系列研究是由荷兰 Wageningen 大学以 De Wit 为首的研究组进行的，这个被称为第一例的激发子蛋白质只能从亲和互作组合、而不能从非亲和互作组合的寄主体内分离到，该研究者的假设是：在非亲和互作中，该激发子产生量非常低，可能在形成后立即与受体分子发生了联结。从激发子只有 3kD 看，这不是没有可能的。

但是，另外的研究组在该互作体系中所做的类似研究对上述结论至少不是平行的。Peever 和 Higgins[39]从亲和互作组合的寄主体内获得一种非专化性抑制子，对叶霉菌产生的非专化性糖蛋白激发子起抑制作用。De Wit[31]认为这种抑制子最有可能是植物产生的，而且可能是非专化性糖蛋白激发子受酶降解的产物，同时它在寄主体内存在的时间可能很短。这些阐述试验结果的方式的启示是：如果类似的抑制子同时存在于产生 *avr*9 产物（上述小种专化性的蛋白质激发子）的亲和组合中，由激发子/抑制子-受体分子互作来解释 *avr*9 产物为什么只能在不发生 HR 的亲和互作组合中检测到，看上去比上面所说的解释更合理。对此已有其他试验指标，可见本文英语稿。

3. 植物控制抗病性的三套基因与抗病性诱导

现在人们已经有了一个很清楚的、共识性的概念：在植物的所谓主动抗病性中，先后有两套基因起作用，R 基因与 *avr* 基因互作，编码与 *avr* 产物识别的效应分子；分子识别启动 *ds* 基因表达，其产物是直接与病原物"战斗"的功能分子或功能事件[40]。主动抗性包括非亲和抗性与诱导抗性，非亲和抗性是靠植物-病原物互作的自然发生完成的，不需要诱导；而诱导抗性，实质上是由事先诱导刺激引发的非亲和抗性，也就是使植物与病原物互作由原来的亲和转变成不亲和的过程[41]。植物控制诱导抗性的基因经常被称作"潜在的基因(latent gene)"，它的意思是这类基因不是或还未能以编码可遗传的表型来运作；更大的意义是：它指示植物在与微生物（病原物）共同进化中保存了整套对各种病原物侵染和致病都有效的基因贮备。很长一段时间以来，我们一直试图主张把植物控制诱导抗性

的基因称作第三套基因(*set*-3)。在1994年6月召开的"杭州第二届国际植物病理学术研讨会"上，董汉松根据这个主张对烟草抗赤星病诱导的研究作了统领并作了大会发言[42]，与会的代表中在分子植物病理学或诱导抗性方面有相当长时间研究的几位先生，其中包括在植物病学界和生物学界有相当影响的前辈，很友善、很中肯地指出了两点：①理论问题是不容易扯得清楚的；②对试验研究，推论的东西不能太多。

这两点对我们都非常有帮助，至于研究与理论综合之间是不是存在有说服力的联系，主要的是看论文即研究报告，这对我们是一个长期的、也是满怀信心的任务。现在要说的就是这个关于第三套基因的立论。它有3个困难：①所谓第三套基因与公认的前两套，即R和*ds*，不是一种同位概念；②参与诱导抗性的基因至少在*ds*水平上，都与非亲和抗性中的相同，差别是在不同的互作体系中，*ds*表达的层次性(基因种类)和时序性有不同；③*ds*控制的功能分子和功能事件，在这两类抗性机制中也很相似；用抗病防卫的"链-环"反应来说，属于相同的总的反应系统，差别也仅仅在作用的层次性和时序性。很明显，概念的不同位是一个主要困难。

再看积极的方面，即把控制诱导抗病性的基因看作与R和*ds*不同的第三套基因的主张，它的理论意义和必要性至少可以从以下3点来考察。

第一，第三套基因是植物-病原物共同进化历程中保存下来的基因贮备之一，这种贮备除了抵抗病原物的功能，更重要的是指示了某种植物形成时原初的基因库景象，即这种原初基因库是生命本源的，并在组织、结构和成员上准备好了对付一切将要参入进来的因子。对抗病性来说，非寄主的广泛存在及专化性程度不等的互作体系的形成，分别指示了作为所谓基因贮备库之一的抗病相关基因的"守恒性"及植物与病原物在共同进化中敌对与适应的过程。这就是说，从了解植物-病原物共同进化的机制出发，第三套基因是一个很好的视点。

第二，这个视点的方便性和意义在于目前的研究手段除已经揭示出这种共同进化关系的某些线索，例如PRP、HRGP及上文谈到的*avr*基因的情况，还勾勒出这样一条脉络：抗病防卫中的不同功能因子的编码基因在进化上各来自一个共同的祖先基因家族，功能相近的基因族紧密连锁(孟德尔位点)在同一条染色体上(这是已被证明的普遍现象)；染色体的结构、功能分区、基因种类及染色体组成的整个物种基因组(贮备库)在某个物种的祖先中都是相同的，进化过程中每条染色体上发生的微观变异积累成宏观变异[15-17]，或由某种大的影响因子造成的大的变异，导致新的种下单元甚至新的物种的产生。对植物-微生物互作来说，宏观进化使微生物成为病原物，进化的不同程度是病原物种下的亚单位(如生理小种或致病变种)及植物不同抗病类型形成的原因；特定互作体系是共同进化现阶段的表现，各类基因的重复顺序、多个拷贝、非功能基因(病原物的已于前述，植物的可参见文献[43]所述PR-1"假基因")的存在等特性，是植物和病原物对共同进化压力的缓冲因子，使双方的互作关系在进化的某个阶段内保持稳定。

第三，最重要的一点是，第三套基因确实存在并遗传(基因贮备在世代间传递)，但不能按编码可遗传的性状的形式运作，必然包含着某种特殊的调控因子或操纵机制。一个笼统的解释是，在这样的体系中共同进化还没有达到植物-病原物互作的自然发生可以实现从R到*ds*基因表达的水平，但这还不是对第三套基因运作机制的解释。最容易想到的一个原因是，基因组中存在R或*ds*的抑制或阻遏基因。这需要作这种假设，即基因启动按

两个层次来实现：①诱导刺激直接作用于 R 基因，即诱导了 R 基因的表达，它编码识别产物，该产物与 *avr* 基因产物发生分子识别、引发 *ds* 基因表达，就是说，诱导是通过第一套基因起作用的。在这种情况下，抑制子或阻遏子原来是制约了 R 基因的启动，诱导处理是对 R 的解除抑制或去阻遏作用。②诱导刺激直接作用于 *ds* 基因，它的作用代替了非亲和抗性中非亲和互作信号对基因的刺激。在这种情况下，抑制子或阻遏子制约的是 *ds* 基因的启动，诱导处理是对 *ds* 的解除抑制或去阻遏作用。

这两点对理解第三套基因的运作非常重要，不仅对从现有研究已提供的线索按上述第二方面所说的脉络所作的继续研究，而且尤其对抗性诱导能否导致新的基因出现两方面都有启发，尤其是后一方面。对前者，类似 *avr* 的显性上位抑制基因的因子可能也存在于植物基因组中，例如在菜豆中，首先发现的伸展蛋白基因联结因子 EGBF-1 抑制的看来是基因(*ds* 类)转录本(mRNA)[44]，而伸展蛋白的联结蛋白质 EBF 可以联结 DNA 片段，可能有抑制 ds 基因启动的作用[45]，但对抑制分子的基因尚未克隆到，对抑制基因与伸展蛋白基因在染色体上的分布、两者如何发生相互影响等，将是一项很有意义的研究。对后者，目前所发现的各类 *ds* 基因的诱发都是转录水平上的激活，诱导抗病性的发生看来并不包括新基因的产生，即使这种新基因可以由一个核苷酸的变化或复制起点一个核苷酸的错位而引起[46]。联系到 PRP 控制基因可以通过体细胞无性系变异途径而从诱导型变为组成型表达的事实，我们感到人们对上述 R 或 *ds* 的阻遏或抑制、去阻碍或解除抑制，总之是第三套基因的运作机制，了解的还十分有限。

四、结　　语

在构思这篇文章的主题立意和决定对试验事例的取舍与解释时，我们在相对的两方面作了仔细权衡：①言必称大、大而无当、窥一斑而描绘全豹的思维方式是科学的大敌，这要求我们从一个事实作推论时一定要根据试验结果本身，例如，菜豆 EGBF-1 是用足纹法测定表明它保护了伸展蛋白基因的一个 1.8kb 的特定区段[44]，所以至多只能推论到 mRNA 抑制子的水平；②对已经积累的试验事实隐约暗示的脉络，经联系和比较、推论和假设使它明朗化并由此得出一般认识，这是各种学说或理论的形成所遵循的过程。以这两点为原则，本文关于植物诱导抗病性的共同进化和意义主要是介绍前人的观点，只作了有限的假设和扩展；而关于诱导抗性的遗传学基础突出了"亲和向非亲和互作转化"的基因运作机制，特别是关于第三套基因(*set*-3)的界定和它如何运作的假设，对援引的 *ds* 基因及产物方面的事实的详细情况，被安排在"抗病防卫反应的功能因子"部分、分 4 个专题介绍。

参　考　文　献

[1] Bol, J. F., Linthorst, H. J. M., Cornelissen, B. J. C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. Annu. Rev. Phytopathol. 1990, **28**: 113—138.

[2] De Wit, P. J. G. M., Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 1992, **30**: 391—418.

[3] Hadwiger, L. A., Nonhost resistance in plant-fungal interaction. In Molecular Signals in Plant-Microbe Communi-

cations(Verma,D. P. S. ed.). Boca Raton:CRC Press,1992,. 85—96.
[4] Gabriel,D. W. ,Rolfe,B. G. ,Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 1992,**28**:365—391.
[5] 董汉松,非亲和性识别与逆反理论。山东科学,1993,**6**(2):102—104。
[6] McIntosh,R. A. ,The gene-for-gene relationship in anticipatory resistance breeding. Abster. 3rd Int. Congr. Plant Pathol. Berlin:Paul Parey,1978,283.
[7] Heath,M. C. ,Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal invaders. Can. J. Plant Pathol. 1987,**9**:289—397.
[8] 吴文希,植物病理学。台北:昌茂图书有限公司,1984。
[9] Goodman,R. N. ,Kiraly,Z. ,Wood,K. R. The Biochemistry and Physiology of Plant Disease. Columbia:Univ. Missouri Press,1986.
[10] 董汉松,根瘤菌、根癌土壤杆菌与寄主植物接触识别的机制。山东农业大学学报,1994,**25**:367—373。
[11] Gabriel,D. W. The genetics of plant pathogen population and host-parasite specificity. In:Plant-Microbe Interactions, Molecular and Genetic Perspectives(Kosuge,T. ,Nester,E. W. eds.). New York:Macmillan,1989,**3**:343—379.
[12] Djordjevic, A. A. ,Gabriel, D. W. ,Rolfe, B. G. *Rhizobium*,the refined parasite of legumes. Annu. Rev. Phytopathol. 1987,**25**:145—168.
[13] 马庆生,植物病原细菌中的 *hrp*,*dps* 和 *hsp* 基因。见:农业生物技术进展与展望(贾士荣主编)。合肥:中国科学技术大学出版社,1993,87—96。
[14] 何晨阳、王金生,试论病原物的致病基因。植物病理学报,1994,**24**:97—99。
[15] Vanderplank,J. E. Plant Diseases,Epidemics and Control. New York:Acad. Press,1963.
[16] Vanderplank,J. E. Principles of Plant Infection. New York:Acad. Press,1975.
[17] Bull,A. T. ,Slater,J. H. Microbial Interactions and Communities. Vol. 1. London:Acad. Press,1982, 287—322; 357—406.
[18] 何晨阳、王金生,植物病原细菌寄主范围的决定因子。微生物学通报,1992,**19**:299—302。
[19] Swarup. S. ,De Feyter,R. ,Gabriel, D. W. An *X. citri* pathogenicity gene has DNA sequence similarity to *avr* genes from *X. malvacearum* and *X. vesicatoria*. Phytopathol. 1990,**80**:961.
[20] De Wit,P. J. G. M. ,Van Kan,J. A. L. ,Van den Ackerveken,A. F. J. M. Specificity of plant-fungus interactions: molecular aspects of avirulence genes. In Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions,Vol. 1 (Hennecke,H. ,Verma,D. P. S. eds.). Dordrecht:Kluwer Acad. 1991,233—241.
[21] Heath,M. C. The role of gene-for-gene interactions in the determination of host species specificity. Phytopathol. 1991,**81**:127—130.
[22] Dahlbeck,D. ,Stall,R. E. Mutations for change of race in cultures of *Xanthomonas vesicatoria*. Phytopathol. 1979, **69**:634—636.
[23] Coplin,D. L. Plasmids and their roles in the evolution of plant pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 1989,**27**:187—212.
[24] Dong,H. S. ,Liu,A. X. Contact recognition and latently systemic infection in Chinese cabbage soft rot:A view from the studies in China. In Plant Pathology and Biotechnology(Li,D. ed.). Shanghai:Shanghai Sci. Tech. Pub. 1994,53—71.
[25] 向太和,谈谈改变传统观念的转座因子。生物学杂志,1991,**44**(6):4—8。
[26] Kearney,B. ,Ronald,P. C. ,Dahlbeck,D. ,Staskawicz,B. J. Molecular basis of evasion of plant host defense in bacterial spot disease of pepper. Nature,1988,**332**:541—543.
[27] Bonas,U. ,Stall,R. E. ,Staskawicz,B. J. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avr* Bs3 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Gen. Genet. 1989,**218**:127—136.
[28] 董汉松,植物识别子与病原细菌识别子间的相互作用。植物生理学通讯,1991,**27**:391—396。
[29] 董汉松,病原细菌对寄主植物吸附的生物学。烟台师范学院学报(自然科学版),1991,**7**(2):66—73。

[30] Ellingboe, A. H. Changing concepts in host-pathogen genetics. Annu. Rev. Phytopathol. 1981, **19**: 125－143.

[31] Scholtens-Toma, I. M. J., Joosten, M. H. A. J., De Wit, P. J. G. M. Appearance of pathogen-related proteins in plant hosts. In: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals (Cole, G. T., Hoch, H. C. eds.). New York, London: Plenum Press, 1991, 247－266.

[32] Oliver, R. P. A model system for the study of plant-fungal interactions: tomato leaf mold caused by *Cladosporium fulvum*. See Ref. 3, 97－108.

[33] Kombrink, E., Hahlbrock, K., Hinze, K., Schroder, M. Molecular response of potato to infection by *Phytophthora infestans*. In Biochemistry and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions (Smith, C. J. ed.). Oxford: Oxford Sci. Pub. 1991, 237－254.

[34] Dean, R. A., Timberlake, W. E. Production of cell wall degrading enzymes by *Aspergillus nidulans*: A model system for fungal pathogenesis in plant. Plant Cell, 1989, **1**: 256－273.

[35] Michelmore, R. W., Ilott, T., Hulbert, S. H., Farrara, B. The downy mildews. In Genetics of Plant Pathogenic Fungi (Sidhu, G. S. ed.). New York: Acad. Press, 1988, 53－79.

[36] De Wit, P. J. G. M., Oliver, R. P. The interaction between *Cladosporium fulvum* and tomato: a model system in molecular plant pathology. In Molecular Biology of Filamentous Fungi (Nevalainen, H., Penttila, M. eds.). Found. Biotech. Indu. Ferment. Res. 1989, **6**: 227－236.

[37] Joosten, M. H. A. J., De Wit, P. J. G. M. Isolation, purification and preliminary characterization of a protein specific for compatible *Cladosporium fulvum*-tomato interactions. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1988, **33**: 241－253.

[38] Van Kan, J. A. L., Van den Ackerveken, A. F. J. M., De Wit, P. J. G. M. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr*9 of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. Mol. Plant-Microbe Interac. 1991, **4**: 52－59.

[39] Peever, T. L., Higgins, V. J. Suppression of the activity of nonspecific elicitor from *Cladosporium fulvum* by intercellular fluids from tomato leaves. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1989, **34**: 471－482.

[40] 王金生，寄主-病原物互作。植物病理学报，1992，**22**：289－292。

[41] Madamanchi, N. R., Kuc, J. Induced systemic resistance in plants. See Ref. 31, 247－262.

[42] Dong, H. S.. Liu A. X. et al. (8 abstracts of researches on induced resistance of tobacco to brown spot, with different topics). See Ref. 24, 133－139.

[43] Pfitzner, A. J. P., Beilmann, A., Goodman, H. M., Pfitzner, U. M. Molecular analysis of two PR-1 pseudogenes from tobacco. Plant Mol. Biol. 1991, **16**: 129－139.

[44] Wycoff, K. L., Dixon, R. A., Lamb, C. J. Hydroxyproline－rich glycoproteins in plant microbe interactions and development. See Ref. 3, 407－422.

[45] Granell, A., Pereto, J. G., Schindler, U., Cashmore, A. R. Nuclear factors binding to the extensin promoter exhibit differential activity in carrot protoplasts and cells. Plant Mol. Biol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Genet. Eng. 1992, **18**: 739－748.

[46] Raz, R., Jose, M., Moya, A., Martinez-Izquierdo, J. A., Puigdomenech, P. Different mechanisms generating sequence variability are revealed in distinct regions of the hyeroxyproline-rich glycoprotein gene from maize and related species. Mol. Gen. Genet. 1992, **233**: 252－259.

[47] Murphy, J. M., Hood, E. E. Molecular basis for extensin size heterogeneity in two maize varieties. Plant Mol. Bol. Int. J. Mol. Bol. Biochem. Genet. Eng. 1993, **21**: 885－893.

[48] Loegering, W. Q. The relationship between host and pathogen in stem rust of wheat. Proc. 2nd Int. Wheat Genet. Symp. Lund, 1963. Hereditas, 1966, **2**(Suppl.): 167－177.

[49] Browder, L. E. Parasite: host: environment specificity in cereal rusts. Annu. Rev. Phytopathol. 1985, **23**: 201－222.

[50] Leonard, K. J., Czochor, R. J. Theory of genetic interactions among populations of plants and their pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 1980, **18**: 237－258.

[51] Lindhout, P., Korta, W., Cislik, M., Vos, I., Gerlagh, T. Further identification of races of *Cladosporium fulvum*

(*Fulvia fulva*)on tomato originating from the Netherlands,France and Poland. Neth. J. Plant Pathol. 1989,**95**: 143—148.
[52] Peever,T. L. ,Higgins,V. J. Electrolyte leakage,lipoxygenase and lipid peroxidation induced in tomato leaf tissue by specific and nonspecific elicitors from *Cladosporium fulvum*. Plant Physiol. 1989,**90**:867—875.
[53] Robinson,R. A. New concepts in breeding for disease resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 1980. **18**:189—210.
[54] Preisig,C. L. ,Kuc,J. Phytoalexins,elicitors,enhancers,suppressors,and other considerations in the resistance of R-gene resistance to *Phytophthora infestans*. In Molecular Determinants of Plant Diseases(Nishimura,S. ,Vance, C. P. ,Doke,N. eds.). Tokyo;Jpn. Sci. Soc. Press;Berlin et al. ;Springer-Verlage,1987,203—222.
[55] Vera-Estrella,R. ,Blumwald,E. ,Higgins,V. J. Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells;evidence for the involvement of active oxygen species. Plant Physiol. 1992,**99**:1208—1215.
[56] Bailey,J. A. Recognition events associated with specific interactions between plants and pathogenic fungi. See Ref. 33,210—224.

THE CO-EVOLUTIONISTIC AND GENETIC BASES OF INDUCED RESISTANCE

Dong Hansong and Liu Aixin

1. INTRODUCTION

Occurrence of induced resistance of plants to infectious diseases is dependent on the activation and expression of series of genes, which control series of functional events such as biosynthesis of phytoalexin, accumulation of pathogenesis-related (PR) proteins and hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs), and production of enzymes required for lignification and other related responses[1,41]. Such induced genes show a spectrum of similar characteristics including functional division, close linkage at the chromosome, and similarity and conservation in sequences among homologous sources of plant species. These properties allow people to form a general picture of plant-pathogen coevolution. This is the major topic of the present paper, which is also going to present a definition that genes controlling induced resistance are taken as the third set (*set*-3) of plant genes, as a genetic category distinguishable from the first set, resistance (R) genes, and the second set, defense responsive (*ds*) genes, both of which have been widely putative.

2. COEVOLUTION BETWEEN RESISTANCE AND PATHOGENICITY

For plant-pathogen interactions, coevolution is a historical process in which accumulation of micro-evolution results in macro-evolution which leads to the formation of the present status of interactions[15-17].

2.1 Outcomes of coevolution

2.1.1 *Types of resistance* Nonhost resistance[3], incompatible resistance[1] and induced

resistance[1,41] can be considered as the appositive types of plant resistance.

2.1.2 *Categories of the interactions* The concepts of basic compatibility[2], and host-species specificity[11] are the terms describing respectively for the overall ability of pathogenicity, and quantitative degree of plant resistance at the relative definition that resistance is any level of incompatibility relative to the most compatible interaction known[6]. The much finer distinctions are given by Gabriel and Rolfe[4] as homologous and heterologous interactions, and specific incompatibility. This series of terms are not appositive. The specific incompatibility is the cause of the incompatible resistance.

2.2 Molecular and genetic evidences

There is a common phenomenon, i.e. the genes with the same or similar functions closely cluster in the chromosomes or other gene vectors and similarity or homology is in the sequences of the related genes with the same or similar function when from homologous species of plants or microbes. It is the same in both plant genes conditioning disease resistance and pathogen genes conditioning pathogenicity. The clustering is beneficial to coordinating the normal functions and stress responses of the genes, and the homology itself is a indication that the genes are originally from the same gene ancestor. Also, the both properties, especially the former, are the bases of evolving plants or pathogens to be divided into different resistance types or different subspecies units such as race, pathovar and physiological type, and the bases of compatibility differentiation of plant-microbe interactions as well as the bases of the ordered responsibiliy to special signals involved in the defence responsive elements. In the following paragraphes, we focuse the coevolution expressions in the interactions of plant R and *ds* genes, especially the later, with pathogen *avr* genes.

2.2.1 *The expression by pathogenicity conditioning genes* Pathogenicity conditioning genes fall into three categories. The first one is *avr* gene, which interacts directly or indirectly by encoding its products with the R genes to plant hosts and gives the bifunctions of pathogenicity to the compatible and HR induction to the incompatible hosts. The second and third categories are *vir* (virulence) and *hrd* (host range determination) genes. The *avr* genes are increasingly noticed not only for the bifunctions but also for the significance in plant-pathogen coevolution indicated by three aspects.

First, *avr* genes can be taken as a genetic library of the coevolution. This is to imply the fact that the genes are readily mutable and lots of them often nonfunctional. They are found to mutate at a high frequency[22], without affecting their primary roles. If being considered together with the phenomenon that remutation is often found[23], the high frequency of mutation could be beneficial to protecting the functional *avr* genes and even other ones closely linking with them from the coevolutionistic stresses to keep functions stable.

Nonfunction of *avr* genes indicates that some of these genes show no roles in plant-pathogen interactions; their variation has not been attributable to the virulence alleles[4],

and their mutation does not alternate the primary roles, as well as no given function can be observed by their transduction and expression[2]. Therefore, Gabriel and Rolfe[4] said that avirulence is generally a gratutious phenotype. While, if changing standpoints, we could find that such nonfunctional genes may take roles as a genetic library in the coevolution. This meaning could be easy to be understood if being inversely explained, i. e. none can exclude the possibility that these genes may become functional after the coming history of plant-pathogen coevolution, just as no one has known whether the present *avr* genes with the known bifunction were functional or not before an ancient stage in the past history of the coevolution.

Secondly, the pathological function of *avr* genes could be originally derived from fundamentally biological function possessed by such genes. It is observed that *avr* genes are closely related with biological and physiological roles of plants. For example, some spontaneous mutations affecting *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum avr*6 result in reduced water-soaking on all hosts tested by Gabriel and Rolfe, 1990[4]. Similarly, Tn5 mutations affectiong *avr* Bs 2 of *X. c.* pv. *vescatoria* exhibited reduced growth in *planta* on susceptible hosts[4,26]. As indicated by Gabriel and Rolfe[4], perhaps the value of some *avr* genes to the microbes is allelopathic and they function to aid in niche occupation. A further deduction is what has been stated in the start of this paragraph. For this hypothesis, more indications can be awarded, and the critical points are that relatively great deal of the nonfunctional genes have not been lost in the history of plant-microbe coevolution putatively because of their roles other than pathological ones, and that all of organisms, including plants and microbes, are found to attend their environmental niches in the most energy-saving and least life-burdening form.

Lastly, relatively clear pictures of plant-microbe coevolution could be drawn up from *avr* genes. For this, De Wit[2] has presented an excellent hypothesis. Within bacteria, a pathogen can evade the triggering of HR by losing an *avr* gene completely, or other more subtle ways of mutation. It seems that races or pathovars have developed different ways to vary their virulence genes to evade recognition by the host, while the less related pathovars still seem to carry the "authentic" avirulence genes. A similar picture emerges in some plant pathogenic fungi. He gave very good examples. One is *avrD* of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. This gene functions in HR induction on soybean by the tomato pathovar, and has nonfunctional allel in pv. *glycines* of the pathogen. De Wit stated, through coevolution, the *avrD* allel of the soybean pathogen evaded recognition by soybean resistance genes by mutation to nonfunctionality, whereas the related tomato pathogen still has a functional *avrD* gene recognized by a complementary resistance gene in soybean. This reflects a process of the coevolution, at the present stage of which different degrees of specificity of avirulence genes exist.

2.2.2 *Expression by resistance conditioning genes* These genes also fall into three categories. R genes are thought to interact with *avr* genes directly, or indirectly by the

product recognition. The other two are *ds* and *hrd* genes. Evidently, the existence of *hrd* genes implicates the genetic bases of host-pathogen specificity and of course a result of plant-pathogen coevolution at the present stage of its history, just as the same as does the R-*avr* interactions. It is the *ds* genes that have been greatly concerned for their implication in the coevolution and will be emphasized as follows.

The *ds* genes include different species responsible for different defence responsive elements. More details have been understood for genes encoding PR proteins, HRGPs, and enzymes involved in elicitation of phytoalexins and lignification[1,2,44]. All of them show the properties fit to the coevolution, just like those showed by *avr* genes, such as the close linkage and cluster, sequence homology and repeat, and multi-copies. Importantly, the meticulous organization and functional division, especially the responsive element and other aiding factors in the target sequences which are the region receiving signals for the elicitation, prove that induced resistance is no longer suitable to be generally considered as lack of specificity.

A general sketch of origin and development of *ds* genes can be clued from the researches on PR proteins and HRGPs. A special gene family for a special element in the disease defence responses clucters at the chromosomes, and consists of different gene members each of which is responsible for receiving one or more signals to express in encoding an isotype, for instance, of HRGP or PR proteins, which given function alone. The same gene family in the most homologous plant species were derived from the same gene ancestor in the coevolution, and the same molecular organization, functional region division, gene numbers (alleles), and other chromosomal and molecular properties existed in such a common origin. When coevolving with microbes, also together with other stimuli such as wounding, the gene members had gradually differentiated to be specially responsible for receiving certain stimulus signals, and when the coevolution made microbes be pathogens and the compatibility differentiation be formed, signals given by infection, incompatibility, and elicitors from the pathogen have taken part in the establishment of a present status of plant-pathogen interaction and will continue the coevolution as effective factors. The repeated sequences, more than one copies or transcripts from a individual gene, and existence of introns and nonfunctional sequences (such as the pesudo-PR-1 genes in tobacco[43]) could contribute to buffering the coevolutionistic pressures.

There are two groups of researches on HRGPs well in supporting the sketch just talked about. One is by Murphy and Hood[47]. They found that the extensin size heterogeneity exists between two cultivars of maize, and this size difference is because of the peptide length, indicating that HRGP involved in elicitation of induced resistance can be a distinguishable characteristics of plant cvs, and the heterogeneity of such a characteristic is contributed directly by the genetic information. The second group of study is by Raz et al. [46] worked at mechanisms of sequence variability in the HRGP genes of maize and related species. The 500 bp region immediately upstream of the TATA box is highly

conserved in two cvs of *Zea mays* and one cv of *Z. diploperennis*, and contains stretches of sequences also found in the gene of one cv of *Sorghum vulgare*. In the further upstream, significant rearrangements are observed, even between the two maize cvs. The four genes are common at the 5'ends, which are thought to be essential for the gene expressions. Sequence variability occurs at the 3' ends, and is considered mostly due to small duplications and single nucleotide substitutions. There is an intron in this region showing a high degree of sequence conservation among the four genes. The encoding region is the most divergent, but variability arises from duplications of fragments coding for similar protein blocks and from single nucleotide substitutions. Raz et al. hypothysize that a number of distinct mechanisms, such as point mutation, and transposion insertion and excision, are active in the occurrence of the sequence variability, and these mechanisms are revealed in different parts of the gene, probably as the result of the different types of functional constrains acting on them, and of the specific nature of the sequence in each region.

3. GENE-FOR-GENE INTERACTIONS

It is well-known that elicitation of induced resistance be a process in which a compatible interaction is turned into incompatible interaction of a pathogen with its plant host which is primarily susceptible to infection and pathogenicity by the pathogen[41]. This is believed to rely on activation and expression of *ds* genes at the roles of gene-for-gene relations.

3.1 The concept development

In near 50 years after gene-for-gene hypothesis was presented, significant modification and development have been acquired for the concept. We focus on three aspects. First, the concept of "aegricorpus"[48] is a primary statement of plant-pathogen interactions. Secondly, at the present, gene-for-gene concept contains at least three critical characteristics. Lastly, three basic models on R-*avr* interactions[4] were put forwards all based on the conception that gene-for-gene relations are widely followed by different types of interactions, which is a dominant line of the concept development[49,50].

Operations of gene-for-gene interactions are different, fundamentally depending on gene numbers for resistance and avirulence[2,4,20]. When two genes control resistance and avirulence, nonallelic suppressions are thought to be given by the domimant inhibitors, resulting in nonfunctionality of resistance, or virulence or avirulence genes[32,33]. In the case of many genes controlling resistance, the interactions appear to follow the roles of gene-for-gene relations or additive patterns[34,35]. Besides gene numbers, effects can be exerted by conditions under which the interactions perform, even in the case of single gene for the countering[49,53].

3.2 The model gene-for-gene interactions

The well-known three basic models for R-*avr* gene interactions are all defined at an

assumption that product recognition of the two countering genes triggers the responses leading to resistance or susceptibility of a plant to a disease[4]. Two modified forms of models are derived from the elicitor-receptor model, and called elicitor/suppressor-receptor and elicitor-suppressor/enhancer-receptor models[54]. In elicitor-receptor model and its reforms, the elicitors are taken as a factor involved in plant-pathogen interactions directly by which it elicit plant defense responses, and such an elicitor differs from those thought and used by plant biochemists.

Schlotens-Toma et al. [31] described a few models in the basic elicitor-receptor interactions: (1) avr gene interacting directly with R gene products, occurring in lettuce-*Bremia lactucae* system in which 18 dominant and single R genes are matched by 18 dominant and single *avr* genes and no products as diffusible elicitors have been found to be encoded by the *avr* genesl; (2) elicitor/suppressor-receptor form, which can be obeyed in several pathosystems with tomato- *Phytophthora infestans* as a representative; indeed, the form of elicitor-suppressor/enhancer-receptor is also expressed in this pathosystem[54]; (3) elicitor-receptor model without known suppressors, for which soybean-*Collectotrichum lindemuthianum* interaction was taken as a representative, and (4) elicitor-receptor model performing with race-specific proteinaceous elicitors, the primary products of *avr* genes, fundamentally differing from the three interactions just mentioned above in which the elicitors are glycoproteins, saccharides, or lipoids.

More words are thought to be necessary for the fourth model. It is an only demonstration so far that products of *avr* genes have been obtained and characterized. This was done by De Wit's research group worked at tomato-*Cladosporium fulvum*. In this pathosystem, the host can be classified into near-isogenic lines (NIL) with resistance genes giving clear-cut resistance to the pathogen[36,51]. From these NILs, genes Cf4, Cf5 and Cf9 have been available[2,55] and at least Cf4 and Cf5 are involved in superoxide dismutase (SOD)/active oxygen species reaction systems[39,55]. Correspondingly, the fungal proteins involved in the interaction can be divided into two categories: proteins thought to be important in obtaining or establishing basic compatibility; and race-specific elicitor proteins acting in gene-for-gene roles to induce HR on incompatible host lines[2,35]. For the former, a 14 kDa peptide from compatible interaction may take roles for basic compatibility[37]. For the later, what has been called the only characterized product directly of the *avr* gene is a 3 kDa protein encoded by the gene *avr*9 of the fungus. Details of molecular and genetic properties have been summarized by De Wit[2]. This elicitor protein is noticeable in two aspects. First, the fungal races containing *avr*9 are able to induce HR of the host lines containing Cf9, and races without *avr*9 show no HR inducing role and from these races no sequence homology with *avr*9 was observed. Secondly, the elicitor protein can only be obtained in apoplastic fluids of the compatible interactions and can not from those of the incompatible ones. A reasonable mechanism is existence of race-specific suppressors in the compatilbe interactions, but such suppressors specially acting on the pro-

teinaceous elicitors have not been found. Scholtens-Toma et al.[31] gave an explanation that the elicitor protein is only present in very low amount and it possibly binds to receptor sites as soon as it is produced. This is not impossible, because the protein is only 3 kDa and should be actively diffusible in adding movement to contact the receptor.

In the same pathosystem, Peever and Higgins[39] isolated the suppressors acting against nonspecific glycoproteinaceous elicitors in compatible tomato-*C. fulvum*. Also, the other specific elicitors from apoplastic fluids of tomato infected with the fungus showed function of inducing SOD activities in incompatible interaction between the Cf5 line and race 4, but not in compatible interactions between the Cf4 line and races 4, 2. 4. 5, and 2. 4. 5. 9, and compatible between Cf5 line and races 2. 4. 5 and 2. 4. 5. 9. The three categories of elicitors, De Wit's protein, Peever & Higgins's suppressor-acting elicitors, and Vera-Estrella & coworker's SOD-inducing elicitors, all show some common roles of inducing SOD activity, electrolyte leakage, and tissue necrosis. This phenomenon leaves the further deductions free and greatly attractive.

3. 3 The third set of plant genes

The so-called active resistance indeed include two mechanisms; race-specific or incompatible resistance, and induced resistance. A widely accepted schedule is that the R-*avr* interactioin or product recognition in the strict sense of gene-for-gene relation initiates the expression of *ds* genes which encode the functional elements in plant disease defence. In the case of incompatible resistance, this procedure can be accomplished by the natural operation of plant-pathogen interactions. While in induced resistance, it is artificially or previously, before plants and pathogens come into interacting, elicited by pretreatments with divergent inducers, including elicitors, and such a stimulus given by inducers is equal to the natural signals from the incompatible interactions. It is some long periods that we have an idea that genes controlling induced resistance could be taken as the third set of plant genes (*set*-3), differing from the R and *ds* genes.

There are three aspects of difficulties in the expectation that the suggestion of *set*-3 genes is accepted. First of all, the concept of such *set*-3 is not appositive to R and *ds* genes. They are all the genetic libraries conserved in coevolution history, but evolve to perform at different mechanisms. The so-called *set*-3 genes include both *ds* and, most possibly, R genes, in the terms of their being activated. Secondly, as a general, the same species of *ds* genes can be activated in both the incompatible resistance and induced resistance, between which the differences are only the orderliness and timeliness of gene expressions and alternation in gene species to take roles dependently on interaciton systems. Lastly, the functional elements are also similar in the both resistance mechanisms. In conclusion, incompatible resistance and induced resistance belong to the same general system of responsive chain and network of plant defence against diseases.

There are also three aspects for pertinency of the suggestion. First of all, the *set*-3 genes really exist in plant genomes but do not perform in the pattern of encoding hered-

itable phenotypes. A reasonable assumption is that certain suppressive factors act against R or *ds* genes and therefore activation of the *set*-3 genes could be achieved at two levels. One is at R genes and the other at *ds* genes. Details for the later have been much known in transcription activation but no known whether the suppressors exist or not in nucleotide sequences of *ds*, even though related results with great enlightenment have been acquired on soybean HRGP, which proved two kinds of suppressors respectively binding to protein of the extensin and DNA fragements of the HRGP genes[44,45]. Whereas for the former, completely no has been known so far. Secondly, it is well established, as discussed above, that the *set*-3 genes are the unique insights for understanding plant-pathogen coevolution. Lastly, such an understanding has lead to a general sketch on the coevolution, also described above, which remains to be known for details and real processes and mechanisms, especially the relationships between R and *ds* gene activation as concerned to coevolutionistic significance.

4 REMARKS FOR THE COMING TOPICS

Plant-pathogen interactions are the considerably complicated responsive chain and network. Implications of coevolution reflected by R and *avr*, or *ds* and *set*-3 genes are correlated and attractive to us, thus we try to get a general understanding in this paper, detailed experimental evidences from different researchers will be included for the topics in the other papers.

The critical pertinency of the *set*-3 suggestion is adding to know whether R genes can be targeted by induction treatments, and whether new genes can be induced to produce by the methods of elicitation of induced resistance which differ from chemical and genetic mutations, or not. Enlightenment can be available from, besides those have been mentioned in this article, the phenomena that PR genes can become constitutive expression by genetic transduction or celluar engineering, probably due to removing of suppressors acting against R genes; the related papers have been included in this book.

植物诱导性抗病因子

徐文联　王金生

一、引　言

植物受到病原物等各种异常因素刺激后，会发生一系列的防卫反应，产生出许多在受刺激前没有的结构、事件和物质等。其中与抗病作用有关的称作诱导性抗病因子。植物的这类抗病因子从产生过程和功能特征上可分为三种类型：①诱导性结构抗病因子；②诱导性抗病反应的功能分子；③诱导性抗病作用的生化反应事件。前二种包括植物受异常刺激时所产生的次级结构如周皮、胼胝体、胶滞体、侵填体、乳突、晕圈及一些功能分子如植物保卫素、酚类物质、PRP、病原物酶抑制剂、硫堇等。它们的抗病中的作用是直接参与对病原物的抵抗。第三种包括植物受异常刺激时细胞的木质化和木质素沉积，富羟糖蛋白的积累以及有关酶系统的诱发合成等。它们在植物抗病中的作用是相对间接的。近几十年来，经过植物保护学家、生理生化学家及分子生物学家等的共同努力，对植物诱导性抗病因子的种类、抗病作用、分子生物学特征等已有了较全面的研究[1]，并取得了较丰富的资料。本文的主要内容是大致概括一下近年来国内外在这方面的研究状况，以抛砖引玉，促进该领域知识的交流。

二、诱导性抗病因子的组成简介

1. 结构因子

（1）周皮：是植物中取代表皮结构的次生保护组织。它容易在植物老的根茎表面形成。其结构分木栓层、木栓形成层和栓内层。幼嫩的植物组织不具有周皮，但当植物受到病原物进攻时，在侵染点处会形成周皮结构以限制病原物生长，阻止病原物的再次侵染。因此它的产生对植物抗病起着一定的作用。

（2）胼胝体：是植物中的一些碳水化合物，当病原物侵入后，在侵染点下形成的沉积体。由于它的积累封锁了细胞胞间连丝中的空隙，因此限制了病原物的进一步侵入和在细胞间的传播，同时也保护了细胞内体液和水份的外漏，从而增强了植物的抗病能力。

（3）胶滞体：它是一种胶状物质，常被于导管壁内。当植物受病原物侵染时，能充满整个受侵染部位的导管腔。因此，能够阻止病菌孢子在植物体内的扩散，限制病症发展。在抗感植物品种中，在病原物侵染处，它都能够形成。但是在感病的情况下，常会被病原物的胞外酶分解。

（4）侵填体：是植物维管束旁细胞的细胞壁向木质部突出、进入导管后形成的结构。这种结构在病原物侵入抗感品种中都能够形成，但在抗病品种中形成的量和速度都远比在感病品种中所形成的大和快。它所起的抗病作用是阻止病菌的扩散和传播。

（5）乳突：是病原物穿过抗性寄主细胞壁的过程中，寄主细胞壁内表面形成的碳水化合物和纤维素的积累层。当病菌穿透原生质壁后，它能继续形成，其外层呈圆顶形，所以称作乳突。它的产生能有效地阻止病菌穿透寄主细胞，延迟病菌进入细胞的时间，以致形成坏死反应。乳突中间时常还存在有木质素、硅、软木脂等成分，这也增加了对病原物的抗性。

（6）晕圈：它是病原物侵入寄主过程中，由于对寄主细胞壁的降解而在寄主上病原物的侵入点四周形成的降解痕迹。此痕迹中常含有纤维素、胼胝体、木质素等。这些成分都对病菌的致病因子如胞外酶等具有一定的抑制作用。因此，晕圈的形成，也能防止病菌的再次侵染。

2. 功能分子

（1）酚类物质：植物在受到病原物或其他因素进攻时，常产生如下酚类物质：羟基二酚、绿原酸、伞形酮、7-羟基-6-甲氧基香豆素、异栎皮（黄）酮、甲氧基氢醌、熊果苷、2，4-二羟-7-甲氧-1，4-谷甾醇、根皮葡糖苷、methoxy，melleinfaliarinol、花色素苷等，这些物质有的是病原物的拮抗剂，能够抑制真菌孢子萌发和菌丝生长；有的能抑制病原物毒素及酶的产生或使其钝化。因此，它们都能够不同程度地参与对病原物的抵御。但是，也有一些由诱导而产生的酚类物质对病原物没有作用。

（2）植保素[2]：它是植物受到病原物侵袭时，体内合成的一类对病原物有一定抗性的化合物。它对病原物的抗性主要表面在抑制真菌孢子的萌发、芽管的伸长、幼孢子及菌丝的生长，对菌丝末梢的细胞也有毒害作用；同时它也能抑制细菌的生长。最早研究的是豆科植物异黄酮类植保素和茄科植物的萜类植保素，后来研究的还有脂肪酸类、聚乙烯类等。无论是病原微生物还是非病原微生物都能诱导植物产生植保素。但是病原物对植保素具很大的耐受性，且常具有分解、修饰植保素的能力，而非病原物对它则很敏感。这说明病原物致病常需要具备一些专门的能力。

（3）病原物酶抑制剂[3]：植物受病原物侵染而产生的抑制病原物的物质主要有蛋白酶抑制剂（PI）和多聚半乳糖醛酸酶抑制剂（PGIPS）。它们在抗病中的作用是多方面的。如作为病原物贮藏蛋白、内源蛋白酶、内肽酶的抑制因素，抑制病原物对植物的作用。目前它们的部分诱导因子已被鉴定出来，产生机理也得到了一些研究。

（4）病程相关蛋白（PRP）[4]：是植物在抗病或感病过程中，比正常植物增加的所有蛋白质的总称。最初由 Gianinazzi 和 Van Loan（1970）在用 TMV 接种的烟草中发现，后来其他人又在菜豆、芹菜、番茄等植物中加以研究。由于它们在特定的病理条件下受诱导产生，因此，Antoniw 等（1980）将此类蛋白称作病程相关蛋白（PRP）。目前研究最详细的是烟草中产生的各类 PRP。PRP 在植物抗病中的作用，除 β-葡聚糖酶和几丁质酶被发现能够直接降解病原物外，其余尚不清楚。

（5）硫堇[5]：是一类从许多不同植物的不同组织中分离到的结构类似的蛋白质，由于它对一些植物病原物具有毒性，因此在植物抗病中起一定的作用，在植物遭到病原物侵染时合成增加，因此也属于一种诱导性抗病因子。

3. 功能事件

（1）富羟糖蛋白和富甘糖蛋白（HRGP 和 GRP）的积累[6]：这二类糖蛋白是植物细胞

壁主要的结构蛋白，前者具有特征性的Ser(Hyp)五肽重复序列，后者具有(Gly-X)n(X-Gly)的重复序列。它们自身交联并与细胞壁其他组分相连，平时维持着细胞壁骨架结构，且赋予细胞壁一定的伸缩性。但当病原物侵入和细胞壁受损时，它们会大量积累以修复和增强细胞壁的结构。同时，这两种糖蛋白还可以对病原物进行凝集、降低病原物在组织中的运动能力，间接地起到了抗病的作用。

(2) 木质素的积累[7]：木质素是多个苯丙烷单体在酶催化下脱氢聚合而成的化合物。植物受病原物侵染时，常在受侵染的部位大量形成木质素沉积，抗病反应中形成的量比感病反应中形成的量高。有时在抗病反应中也会有新型木质素的形成。木质素合成的途径主要有莽草酸途径、苯丙烷途径、肉桂酸途径；合成前体是一些糖苷、有机酸或醇。另外，香豆醇聚合也可以形成木质素。木质素在抗病中的作用是它可以作为一种物理屏障限制病原物的扩散。同时，它的一些前体，如松柏醇、β-香豆酸、阿魏酸、咖啡酸也能抑制病原物的生长。

(3) 寄主酶：这类酶是指当植物受到病原物侵染时，新产生的或被诱导而大量产生的催化一些诱导型抗病因素的合成或直接作用于病原物的酶。它们主要包括：PAL、CHS、CHI、β-糖苷酶、酪氨酸水解酶、咖啡酸-0-甲基转移酶、香豆醇脱氢酶、多酚氧化酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶、多酚氧化酶、NADPH 氧化酶、蛋白酶、几丁质酶、β-葡萄糖苷酶等。

PAL 是植保素、木质素、酚类物质合成的关键酶；CHS 和 CHI 参与豆科植物植保素的合成；β-糖苷酶将糖苷转变成酚类物质，从而对病原物产生毒害；酪氨酸水解酶、咖啡酸-0-甲基转移酶、香豆醇脱氢酶都参与木质素的合成；过氧化物酶也参与木质素的合成，还能催化酚类物质转变成醌。多酚氧化酶催化醌及单宁酸的合成；超氧化物歧化酶使受侵染的植物体内积累的自由基团或分子转化为过氧化氢，维持了植物体内的平衡从而增强植物的抗病能力和耐受性。几丁质酶、β-葡聚糖苷酶能够抵抗一些含有几丁质的病原物的生长。因此认为，以上各种酶与植物的诱导抗性有关。

(4) 植物激素：与植物诱导抗性有关的植物激素主要是乙烯，它能在受侵染的植物组织中大量合成并促进植物过氧化物酶和多酚氧化酶的产生。同时也能促进 PAL 的合成。另外，它还能诱导富羟糖蛋白的积累。因此能增强植物的抗病性。

三、诱导性抗病因子产生的分子基础

1. 诱　导

不同类型的病原物包括真菌、细菌、病毒和类病毒，不同种类的激发子和其他理化因子如机械损伤、乙烯、水杨酸、阿斯匹林和一些多聚阴离子等，都能诱导抗病因子的产生。如果用病原物直接处理植株、愈伤组织和悬浮细胞，产物分析往往会有病原物残体的干扰。用激发子替代病原物诱导，抗病因子的产生有时会与病原物的不同。

2. 基因表达的时序

用核酸和蛋白质合成抑制剂预处理寄主植物后，再接种非亲和病菌，病菌就能在非亲和寄主中大量生长，表明寄主抗病反应需要有基因的非正常表达。用非亲和病菌处理，寄

主植物的核糖核酸和蛋白质合成或者不增加，或者很快减少，mRNA 转录活性削弱。在基因表达时，一般最先表达的是与植物保卫素合成有关的基因及其有关酶类，其次是水解酶的 PRP，再后是 HRGP 和木质素合成有关的酶类。但是不同植物抗病因子诱导表达时序有变化，不同诱导成分也影响抗病因子产生的先后。欧芹细胞系在激发子作用下，PRP 的诱导早于 PAL。用激发子粗提物处理，菜豆悬浮细胞系中的 PAL、CHS 和几丁质酶基因的诱导表达几乎是平等的，而用部分纯化的激发子处理，这些基因的诱导表达就有先后。

3. 原有基因的活化

寄主植物在感病时也有一些抗病因子产生，但其时空顺序模式与抗病时差别很大。在多数情况下，不亲和系统中抗病因子比亲和系统中的出现时间早，表达量高，但有时表达时间两者基本相似。表明抗病因子基因表达只是原有基因的活化和增强。这种现象在几丁质酶，β-1，3-葡聚糖酶，PAL 等的 mRNA 和蛋白质表达中都有发现。有些抗病因子基因在亲和与不亲和系统中表达动态具有多样性。用抗病因子基因的 cDNA 作为探针，观察大麦接种白粉病菌(*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*)或豌豆接种根腐病菌(*Fusarium solani*)后，不亲和组合的近等基因系品种中的 mRNA 动态多种多样，且随品种而异，少数基因在不亲和组合寄主中诱导速度还低于亲和组合。

4. 产物空间积累

用细胞免疫化学、原位杂交技术、抗病因子组织解剖学和组织化学等方法，结合转基因植物中报道基因表达分析，可以了解植物侵染点周围抗病因子的空间积累。在亚细胞水平上，诱导表达的水解酶常定位于液泡中，部分葡聚糖和大量的 HRGP 常涉及胞壁修饰。病原物诱导使 HRGP 在几分钟内聚合，还可引起细胞局部 Ca^{2+} 瞬间增加，活化质膜 β-1，3-葡聚糖酶，从而在病原物接触的局部胞壁上累积起胼胝体。用丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)诱导带有 CHS 基因与报道基因(Gus)的转基因菜豆的过敏性反应中，坏死组织周围的健康细胞中的 Gus 活性高，而整个叶片中 Gus 活性低，但仍能测出，且随着与侵染点的距离增加，其活性不断下降。

5. 调　控

使用植物悬浮细胞系和病原物激发子，可以研究抗病因子基因表达调控的系统。根据抗病因子基因启动子区的功能分析，已鉴别出一些诱导所需要的同域(cis)顺序和异域(trans)顺序。研究所使用的工具有：凝胶滞后法(gel retardation)，DNA 足迹法(foot prining)，DNA 酶过敏反应，含同域序列的寡核苷酸片段和基因启动子区竞争异域因子的原生质体瞬间表达，转化植物中抗病因子基因启动子区特定同域序列的变动对基因表达的影响，用含同域 DNA 片段的层析柱浓集和纯化细胞的异域因子进而克隆异域因子的 cDNA 或基因等等。

6. 发育调节

CHS8 启动子在根尖分生组织活性很高，而且集中在积累花青素的专门细胞中。CHS8-Gus 基因融合体在花器其他组织和成熟叶、茎中仅微弱表达，但在幼苗发育早期胚

乳中表现了有明显的诱导表达。在未成熟根中CHS的表达活性很高，并逐步向顶端分生组织和根茎交接处集中，侧根形成时新根中和主根受伤处的启动子会受到活化。基因融合体在子叶和新叶中也有表达，但在嫩枝顶端的分生组织不表达。光对子叶和根茎交接处的表达有调节作用，但对发育过程的其他方面没有作用。虽然CHS基因表达有严格的发育程序，但叶片对创伤和激发子的反应在薄壁细胞、维管束组织甚至表皮组织中都能发生，这对有效保护受伤组织不受病原物侵染具有重要意义。

四、诱导性抗病因子的作用协同性和功能多样性

1. 作用的协同性

以上所列述的植物中各种诱导抗病因子在植物的抗病反应中虽然各自都独立地发挥作用，但是，从植物抗病反应的整体来看，这些因子的作用表现出一定的协同性。这种协同性主要表现在两个方面：第一，各种因素在植物系统反应中，产生和发生作用的时间和空间存在着一定的协调关系。一般地，植物受到病原物侵染，首先被诱导而产生的是活性氧，接着是脂过氧化以及胼胝体、植保素的合成，其后是几丁质酶、β-1，3-葡聚糖苷酶，再后是木质素，最后是富羟和富甘糖蛋白的积累。第二，植物对一种信号发生反应，会影响其后对另一种信号的反应。如首先用高温处理豌豆叶荚，诱导了热休克蛋白mRNA活性的增加，再用病原物刺激时，病程相关蛋白的合成就受到了抑制，从而导致植物感病。这种反应又叫做胁迫效应。这两种协同效应与外界信号的种类和植物的生理性状也有一定的相关性。

2. 功能多样性

有些防卫反应基因在某些植物中只有一两个拷贝，但在另一些植物中却是基因簇，有多个拷贝。豆科植物和马铃薯基因组中与异黄酮类植保素合成有关的基因是多基因簇，烟草PR基因多数也是多基因簇。在这些多基因簇中，往往只有部分基因能在防卫反应中诱导表达，另一些基因在植物中还有其他生理功能。PAL涉及到植保素、木质素、花青素等合成；除和抗病反应相关外，木质素参与导管形成，一些黄酮类物质参与抗辐射、诱发根瘤、生长素极性运输或调节一些苯丙烷类合成途径中酶活性的过程。因此，PAL基因除在抗病时表达外，在植物抗辐射、创伤愈合、维管束分化、花青素形成时也很活跃。PRP除和抗病有关外，在花器官发育及衰老时也会累积。HRGP和GRP是细胞壁的重要成分，植物中有组织和发育特异性表达的不同HRGP和GPR基因。这些都表明有些防卫反应基因，如PAL基因，CHS基因等，并不是防卫反应专一化的基因，它们在其他逆境或特定发育阶段也会表达，即这些基因表达具多样性，和它们启动子能接受多种信号调节有关。

五、几种诱导抗病因子的分子生物学特征

1. PRP

自1970年PRP被发现以来，已经有很多种这类蛋白质从不同植物中被鉴定出来。通过研究发现，这类蛋白质在性质上具有一些相似性，如分子量都较小，一般在40kDa以下；大多都是单体，非糖蛋白或脂蛋白；一般呈酸性，也具有碱性异构体；都较稳定，对一般

的蛋白酶不敏感；多数能够分泌到细胞间隙中，也有一些存在于细胞液泡内；进化上具有保守性，来自不同植物的同类 PRP，其分子结构、血清学反应等具有很大的相似性。目前从烟草上鉴定的 PRP 可分为以下五个类群。

（1）PR-1 家族：该家族的蛋白质至少有 4 个成员，可分为两组：第Ⅰ组是酸性的，分泌到细胞外，包括 PR-1a，PR-1b，PR-1c。第Ⅱ组包括这些蛋白质的碱性异构体，到目前为止只鉴定出一种。PR-1 的功能目前尚不知。但是，关于这类蛋白质性质的研究数据和这些蛋白质的定位，以及它们基因的表达调控已有一些报道[8]。

（2）PR-2 家族：PR－2 蛋白家族被鉴定β-1，3 葡聚糖酶[9]。它至少的一个功能是水解β-1，3-葡聚糖多聚体。该活性大小可以通过它在体外作用于高分子量的β-1，3-葡聚糖，释放出还原糖的量来测定。β-1，3-葡聚糖酶被证实它在和几丁质酶一起时具有较强的抗真菌的活性。这种活性可能由于它能降解某些病原真菌细胞壁中的β-1，3-葡聚糖多聚体成分。目前为止，至少有 9 种，可分为 3 个不同结构类型的β-1，3-葡聚糖 cDNA 被克隆出来。这些不同结构类型的β-1，3-葡聚糖酶在氨基酸序列上有 50%的一致性。属于第一种结构类型的至少有 3 种，它们是碱性的，分布在植物液泡中央；属于第二种结构类型的至少有 5 种，它们按氨基酸顺序同源性可进一步再分为两个亚组，亚组间的氨基酸序列同源性为 85%。一个亚组包括 PR-2、PR-N 和 PR-Q，这三种蛋白质是酸性的，定位于细胞外；另一亚组包括 3 到 4 种形式的、从中性到碱性的蛋白质，它们目前只在 cDNA 水平上得到定性。第三种类型的β-1，3-葡聚糖酶目前只在烟草中被发现，是酸性的胞外蛋白。类型Ⅰ的葡聚糖酶大都是相对高特异性的作用于 laminarin 的酶，而类型Ⅱ中只有一个，即 PR－Q，具有高特异性作用于 laminarin 的活性。这种在活性上存在差异的原因尚不清楚。类型Ⅲ有明显的 laminarinase 活性，但和别的酶相比，它可以产生大的寡聚片段，在底物上只有较少的作用位点。

（3）PR-3 家族：PR-3 蛋白家族目前被鉴定为几丁质酶。几丁质酶的功能之一是裂解几丁质。几丁质是除卵菌之外所有植物病原真菌细胞壁的主要成分。体外实验已证实，几丁质酶能够拮抗某些含几丁质的真菌。当它和β-1，3-葡聚糖酶共同使用时，其拮抗几丁质的活性呈几何级数上涨。该结果显示，几丁质在系统获得抗性中直接起拮抗病原物的作用。在烟草中已发现两种在结构上毫不相干的几丁质酶。类型Ⅰ包括两个组。一组是碱性的，定点在细胞液泡中，另一组是酸性的，定点胞外空间。这两种类型的几丁质酶在蛋白质序列上有 65%的一致性。Ⅰ类几丁质酶具有 3 个结构功能域，一个是外源凝集素型功能域，一个铰链或空隙，一个几丁质水解功能域；Ⅱ类几丁质酶只有一个几丁质水解功能域。有趣的是，类型Ⅰ几丁质酶作用于粉末状的几丁质上有一个比类型Ⅱ强 5 倍的特异活性[10]。

（4）PR-4 家族：目前已纯化出一些 PR-4 蛋白质，部分蛋白质的氨基酸序列也被测出，cDNA 也得到了克隆。该类蛋白分布于细胞外，呈弱酸性，分子量大约为 13－14.5kDa。其功能尚不清楚，但它的一级结构和两个在马铃薯中得到的创伤诱导微管蛋白 Win-1 和 Win-2[11]的 C-端功能域和 rubber latex 的一个主要蛋白组分 hevein 的 C-端都同源。值得注意的是，就像烟草中分离的Ⅰ类几丁质酶一样，Win-1，Win-2 和 hevein 都包括一个氨末端的外源凝集素功能域。所以，PR-4 和 Win-1，Win-2 和 hevein 之间的关系和它与Ⅰ类几丁酶之间的关系相似。在对烟草几丁质酶基因结构分析的基础上推测出，Ⅰ类

和几丁质酶结合外源凝集素的功能域能够转位而形成更加复杂的多功能域蛋白。PR-4 能够以具有和没有外源凝集素功能域的形式存在，支持了结构转位的观点。

（5）PR-5 家族：PR-5 蛋白质也被称作 thaumatin 类蛋白质，因为它和从 *Thaumatococcus daniellii* 中分离的蛋白 thaumatin 在结构上有很大的同源性[12]。就像和别的系统性诱导型蛋白家族一样，PR-5 有二个组，一组是酸性的，另一组是碱性的。前者在细胞外，后者在细胞液泡中。这两组蛋白质在氨基酸序列上有 65％的同源性。从烟草中已经分离到了编码这两种 PRP 的 cDNA。这两种 cDNA 有 96％的同源性，分别编码主要和微量的 PR-5 异构体。碱性的 PR－5 有两种形式的蛋白质，也称为 osmotin，被鉴定为高盐胁迫下产生的，聚集在液泡中内含体内。PR-5 的功能尚不清楚。然而该两种蛋白分别以 100％和 65％同源于从玉米中分离的 α-淀粉酶抑制剂。成熟的 PR-5 蛋白有 205 个氨基酸残基，并含 16 个半胱氨酸残基。很明显 PR-5 和玉米蛋白的这种结构很相似。该结果显示，PR-5 的功能可能是某种蛋白酶或淀粉酶的抑制剂。

2. β-1，3-葡聚糖酶

目前为止，至少已从 9 个植物品种中分离纯化得到了 26 种 β-1，3-葡聚糖酶和它们的 cDNA 克隆，一些蛋白质的氨基酸序列和其基因的核苷酸序列也被测出[13]。分析发现，这些 β-葡聚糖酶至少可分为 3 个结构上不同的组。第一组至少包括 4 个碱性异构体，它们在氨基酸序列上存在有 1％的差异。第二组包括 6 种异构体，4 种是酸性的，它们在氨基酸序列上有 18％的不同。第一、第二两组之间的氨基酸序列有 48. 4％的差别。第三组中只含有一种，是酸性蛋白质，它和第一第二两组之间氨基酸序列的差异是 43％。该类酶的催化活性依赖于它结构中的天冬酰胺和谷氨酰胺以及色氨酸和酪氨酸残基。

3. 几丁质酶

几丁质酶也是研究较多的一种酶，目前至少已从 **19** 种植物中鉴定出了 **29** 种几丁质酶[14]。其中只有一种从马铃薯中得到的带有糖基，其余都是非糖蛋白。根据该酶的氨基酸序列，可以将它们分为两个在结构上不同的组。第一组包括类似从大豆和烟草中得到的在催化中心有 **43. 3**％同源性的碱性几丁质酶的一类几丁质酶，有酸性的，也有碱性的。第二组为从 Hevea，Parthenocissus、拟南芥、烟草、黄瓜等植物中得到的，在催化/水解中心有 **48**％同源性的几丁质酶和几丁质酶/溶菌酶。进一步根据氨基酸序列，第一组的碱性几丁质酶可以再分为三种不同类别。

第一类别的几丁质酶包括三个碱性异构体，几丁质酶 A、几丁质酶 B、几丁质酶 C，其分子量分别为 **34kD**、**32kD** 和 **33kD**。这些蛋白在氨基酸序列上有 **83**％的同源性。它们与酸性几丁质酶之间，在氨基酸序列上存在有 **40**％的不同。这些酶的原始结构中具有 **4** 个主要功能域：1 个为 N-末端的信号肽，一个富含半胱氨酸的功能区，一个主要的中心结构和一个 C-末端延伸区。成熟的这类几丁质酶位于液泡中。而酸性几丁质酶位于细胞外空间。第二个类别的几丁质酶是酸性的，存在于细胞空间。它在结构上和第一类别几丁质酶的主要差别在于它没有富含半胱氨酸的结构域和 C-末端延伸。二者的催化功能域是保守的。第三类别的几丁质酶共同具有一个区别于前两个类别几丁质酶的保守序列，它们具有自身独有的功能域。该酶存在于细胞间隙中。其中有个别酶除具有自身的功能域外，还有

前两个类别几丁质酶的功能，如从菜豆、黄瓜、烟草等植物中提取的第三类别的几丁质酶等。

4. 硫　　堇

该类化合物主要分布在细胞壁上，也有在胞内的，在结构上可分为5种类型。类型Ⅰ是高碱性的，不含带负电荷的残基；分子中有4个二硫桥，由45个氨基酸组成，其中8个位于中央二硫环中。目前已鉴定出7个这样的分子。类型Ⅱ呈弱碱性，具有一些带负电荷的残基，但中间二硫环中多一个到2个氨基酸残基；在氨基酸序列上，4个二硫桥的位置和第一类型中的相同。第Ⅲ种类型的硫堇分子含有三个二硫桥，具有较少量的氨基酸残基，有9个氨基酸在中央二硫环中。第Ⅳ种类型的分子呈中性，在氨基酸数目和二硫桥的位置上与类型Ⅱ相似，有较低比例的带电氨基酸残基。第Ⅴ类的硫堇呈中性，在氨基酸序列和二硫键位置方面和以上4类均不同，它缺少第Ⅰ、第Ⅱ类型具有的第2和第8个半胱氨酸。通过核磁共振法对前四类硫堇分子的三维结构研究表明，它们的三级结构是相似的，反应出其功能的相似性。第Ⅴ类硫堇分子的三级结构有待于阐明。

5. 苯丙氨酸氨裂解酶(PAL)[15]

PAL是异黄酮类植保素和木质素合成的第一个关键酶，催化苯丙氨酸裂解，生成反式肉桂酸。它有许多异构体，由多基因家族编码。该酶为四聚体结构。目前编码该酶的基因已在菜豆、甘薯、水稻、欧芹、马铃薯等植物中分离到。

用免疫化学及mRNA原位杂交法证明PAL基因在植物遭到袭击时特异性地在油导管上皮细胞，发育着的木质部和植物表皮细胞中高效表达。这些部位都与值保素、木质素合成有关。另外，不同类型的PAL在植物中产生的部位，以及对外界信号的反应都具有特异性[16]。

6. 4-香豆素辅酶A连接酶(4CL)[17]

4CL也是木质素和植保素合成的关键酶，催化4-香豆酸转化成4-香豆素辅酶A。目前，编码4CL的基因已在欧芹、马铃薯、菜豆、碧冬茄、拟南芥等植物中得到了克隆。不同植物来源的4CL基因在结构上有很大的保守性。该基因能够受紫外线、病原物激发子、非亲和性病原真菌、高强光等诱导。4CL基因表达的组织器官特异性和PAL类似。

7. 查尔酮合成酶(CHS)[18]

CHS是异黄酮类植保素合成的一个主要酶，催化4-香豆素辅酶A转化成3,4-羟基查尔酮，该反应也是黄酮类物质生成的关键步骤。黄酮类物质在植物和微生物的相互作用中起着重要作用。因此，CHS倍受人们重视。目前CHS的编码基因已从短牵牛、拟南芥、菜豆等植物中被克隆出来。CHS主要能被紫外线诱导，并主要在发育旺盛的组织的上皮细胞中生成。真菌激发子等也能诱导CHS合成。

8. 1,2-二苯乙烯合成酶(SS)

SS催化4-香豆素辅酶A生成stil bene植保素。目前该酶的编码基因已从落花生、裸

麦、菜豆中得到克隆。该基因受乙烯、病原激发子等信号诱导。

六、植物诱导性抗病因子的研究展望

从它们可被各种因子诱发来看，植物诱导性抗病因子是植物适应外界环境而具有的一种功能。植物受外界刺激后所产生的因素很多，与抗病有关的仅是其中的一小部分。研究这部分因子的结构与功能，是为提高植物抗病性而服务的。但总的看来，目前，对这部分因素的研究还很不深入，如可能尚有许多抗病因子未被鉴定出来。而一些已被鉴定出来的因子，对其分子结构、抗病机制、产生机制仍了解不多，对其基因的表达调节规律更需深入研究。因此，进一步的研究目标应当力求鉴定出更多的与抗病有关的因子，探求诱导抗病因子的产生条件、分子结构、抗病机制、受诱导表达的规律以及与植物正常生命活动的关系等，从而进一步克隆这些因子的编码基因，以至通过包括基因工程在内的各种手段，利用这些抗病因子，强化植物的抗病性，提高植物的产量。

参 考 文 献

[1] Dixon, R. A., Lamb, C. J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. Annu. Rev., Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1990, **41**: 339－367.

[2] Mansfield, J. W. Induced antimicrobial systems in plants. In: Natural Antimicrobial Systems, FEMS Symposium No. 35 (Gould, M. E. et al. eds.). Bath: Bath University Press, 1986, 101－131.

[3] Ryan, C. A. The reseach for the proteinase inhibitor inducing factor, PIIF. Plant Molecular Biology, 1992, **19**: 123－133.

[4] Van Loon, L. C. Pathogenesis-related proteins. Plant Mol. Biol., 1985, **4**: 111－116.

[5] Gausing, K. Thionin genes specifically expressed in barley leaves. Planta, 1987, **171**: 241－246.

[6] Copper, J. B., Chen, J. A., Van, Holst. G-J. et al. Hydroxyproline-rich glycoproteins of plant cell walls. Trends Biochem. Sci., 1987, **12**: 24－27.

[7] Delmer, D. P., Stone, B. A. Biosynthesis of plant cell walls. In: The Biochemistry of Plants, Vol. 14, Carbohydrates (Preiss, J ed), San Diego: Academic Press, 1988, 373－420.

[8] Bol, J. F., Linthorst, H., Cornelissen, B. Pathogenesis related proteins induced by virus infection. Annu. Rev. of Phytopathol., 1990, **28**: 113－738.

[9] Payne, G., Ward, E., Gaffney, T. et al. Evidence for a third structural class of β-1, 3-glucanse in tobacco. Plant Molecular Biology, 1990, **15**: 797－808.

[10] Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. et al. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis related proteins are chitinases. Pro. Nat. Aca. Sci. USA. 1987, **84**: 6750－6754.

[11] Stanford, A., Bevan, M., Northcote, D. Differential expression within a family of novel wound-induced genes in potato. Molecular and General Genetics, 1989, **215**: 200－208.

[12] Cornelissen, B., Hooft Van Huijsdujnen, R., Bol, J. A. Tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. Nature, 1986, **321**: 531－532.

[13] Ward, E. R., Payne, G. B., Moyer, M. B. et al. Differential regulation of β-1, 3-glucanase mRNAs in response to pathogen infection. Plant Physiol, 1991, **96**: 390－397.

[14] Shinshin, H., Neuhaus, J.-M., Pyals, J. et al. Structure of a tobacoo endochintinase gene: evidence that different chintinases genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. Plant Mol. Biol., 1990, **14**: 357－368.

[15] Cramer. C. L. Edwards, K. , Dron, M. et al. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. Plant Mol. Biol. , 1989, **12**: 367–383.
[16] Dixon, R. A. , Harrison, M. J. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. Adv. Genet. , 1990, **28**: 165–234.
[17] Hanffe, K. D. , Paszkowski, U. , Dangl, J. L. et al. A parsley 4CL-1 promoter fragment specifies complex expression patterns in transgenic tobacco. Plant Cell, 1991, **3**: 435–443.
[18] Lamb, C. J. , Lawton, M. A. , Dron, M. et al. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defense against microbial attack. Cell, 1989, **56**: 215–224.

FUNCTIONAL RESPONSE ELEMENTS INVOLVED IN INDUCED RESISTANCE OF PLANTS TO DISEASES

Xu Wenlian and Wang Jinsheng

The induced disease resistance elements of plants refer to the elements produced by plants after they are attacked by parasites and/or stimulated by other unusual environmental factors. They consist of structural barriers, functional molecules, and biochemical events etc. They can be induced by both biotic and abiotic factors. The molecular mechanisms involved in their forming fall into three main kinds, i. e. , accumulation of cell production, *de novo* expression of plant genes and activation of genes. At present, a lot of such elements have been identified, and their genes have been cloned and expressed *in vitro*. Some genes also have been used in the improvement of plant disease resistance. Helped by molecular biology and genetic engineering methods, the principle and applicational researches on these aspects will be conducted more and more.

植物过敏反应与诱导抗性

徐文联　蒋五玲

一、引　　言

植物过敏反应是指植物在受到其病原物的无毒小种以及其非寄主病原物等的侵入时所发生的组织和细胞的快速坏死反应[1]，在特定的条件下植物受到侵袭后 24 小时之内发生。植物组织和细胞的这种快速坏死，是相对于它遭受到致病病原物的侵入时所发生的组织和细胞的慢速坏死而言的。在过敏反应中，植物细胞的死亡速度是它遭受致病病原物入侵时死亡速度的 4－5 倍。植物的这种过敏反应由于只发生在抗病反应中，因此是抗病反应的一种典型表现。植物过敏反应发生后，很多基因被诱导表达，产生一些物质如植保素、水解酶、蛋白酶抑制剂等能够抑制病菌向植物细胞的进一步侵入。因此，植物过敏反应被认为是植物诱导抗性产生的直接原因，并引起了人们极大的研究兴趣。

过敏反应的概念最早是由 Ward 在 1902 年首先提出来的。1915 年 Stakman 引用了这个概念。1949 年，Müler 最早研究了真菌病原马铃薯晚疫病菌在植物上引起的过敏反应。1961 年 Klement 研究了细菌引起的植物过敏反应。当时他用一定浓度的青枯病菌接种非寄主植物，引起了植物细胞的快速坏死，同时发现病原物不能进一步向植物扩散，植物表现出抗病性。后来发现一般寄生性病原细菌都能在非寄主植物上引起过敏反应，并且证实，在所有细菌中，只有植物病原细菌才能引起植物过敏反应。因此，人们后来用能否在非寄主植物上引起过敏反应这一性状来鉴别该病原物的致病性。60 年代，有关病毒引起的过敏反应也被广泛地研究起来，开始的工作主要集中在植物的交叉保护上[2]。当时研究发现，烟草花叶病毒被接种到一定基因型的烟草上，引起烟草产生坏死斑痕，几天后，在接种和未接种的叶片上，都检测到了对 TMV 再次感染的抗性，于是同时促进了诱导抗性的研究。从中可以看出，在早期植物过敏反应和诱导抗性的研究是紧密相伴的。直到后来发现植物诱导抗性可以由非生物因子或别的不能诱导过敏反应的因子诱发产生后，对过敏反应与诱导抗性的关系才有了进一步的理解。本文简要概述过敏反应的有关研究进展，以便能明确它在植物诱导抗病中的作用。

二、过敏反应发生的机制

植物过敏反应发生的条件是严谨的。首先只有具有一定基因型的病原物才能引起具有一定基因型的寄主或非寄主产生过敏反应。说明过敏反应的发生是受病原物和寄主同时控制的；其次，植物过敏反应的发生需要寄主和病原物的相互接触，否则过敏反应不能发生；第三，过敏反应发生具有很高的效率，一个病原细胞就能够使一个寄主细胞发生坏死。第四，过敏反应发生的典型特征是植物细胞的快速死亡。是什么因素导致植物细胞快

速死亡呢？研究发现，在寄主细胞死亡之前，病原菌的生长首先受到抑制。另外也发现，在植物细胞死亡过程中，细胞膜发生崩裂，电解质渗漏，细胞降解，这说明是一些酶的作用。通过分析酶活性表明，植物本身的脂肪氧化酶、脂肪酸水解酶升高[3]，一些其他类型的水解酶活性也增强，这说明是植物自身酶的作用而导致细胞的溶解。然而这些酶的产生，必然与病原物有着很大的关系。是病原物直接产生一些酶或别的物质，还是病原物导致植物产生一些物质促使植物细胞的死亡，有待于进一步研究。以上几点表明，过敏反应是一个依赖于植物-病原物相互识别的主动的反应过程。

植物过敏反应的发生过程可分为三个阶段，第一阶段为诱导期，一般从接种到接种后2小时；第二阶段为潜伏期，为接种后2－6小时；第三阶段为6小时之后。研究发现，植物脂肪酸水解酶(LAH)、脂肪酸氧化酶(LOX)、过氧化物歧化酶(SOD)，以及过氧化物酶(POD)的增加是在诱导期；与植保素合成有关的酶如PAL、4CL、CHS、CHI等的合成，包括植保素的出现是在潜伏期；在这一时期，一些水解酶也开始产生。这说明酶的产生为植物细胞的死亡裂解创造条件。同时植保素的合成可能是病原物生长受到抑制的原因之一。在症状期，植保素合成量逐渐加大，直至达到最大值。在整个过程中，对于过敏反应的来说，只有LAH、LOX是诱导期特异产生的。SOD、POD可能为限制细胞坏死所需要的，其余的物质都可以由别的因素诱发产生。以上的各种反应，在组织化学水平、DNA原位杂交水平上都得到了证实。

三、植物过敏反应的影响因素

植物过敏反应发生的影响因素主要有以下几类[5]：

(1) 具有特定基因型的植物病原物和特定基因型的植物之间的匹配。

(2) 病原物的浓度：细菌接种物浓度在5×10^6cfu/ml以下产生细胞水平的寄主细胞坏死；10^6-10^8cfu/ml之间发生组织水平的坏死；接种物浓度在10^8cfu/ml以上影响典型症状的形成。

(3) 环境因子：过敏反应发生的环境影响因子有温度、光、湿度、化学因子等。其最适温度为16－28℃，37℃以上，过敏反应受到抑制；其对光的要求为正常光照；相对湿度在50%左右过敏反应容易发生；在化学因子中，Ca^{2+}能抑制或加快过敏反应的发生，这很可能与酶的活性有关；另外，一些有毒物质，如重金属、抑制氧化和磷酸化作用以及蛋白质合成作用的因子都能抑制过敏反应的发生。最近发现一种叫Allopurinol的化合物也能抑制植物过敏反应的发生。

(4) 被接种植物叶片的年龄：一般比较幼嫩的植物叶片，较易发生过敏反应。

(5) 接种物生理状态：引起过敏反应的诱导物，以活性高的较好。处于对数生长期的病原物，比较容易引起过敏反应。

(6) 接种水平：过敏反应发生与否，与接种水平关系较大，一般需要将病原物注入叶肉细胞，使病原物与植物细胞直接接触。否则过敏反应就很难发生。

四、过敏反应的基因控制

过敏反应是特定的病原物作用于特定的植物而诱发的反应，因此它一定受控于特定

的基因。据研究，植物的过敏反应是由植物和病原物共同控制的。在病原物中有两种基因，一种叫 *hrp* 基因[6]，它控制病原物在寄主植物上的致病性和在非寄主植物上引起过敏反应；另一类是非致病病原小种的无毒基因[7]，它控制在具有小种专化性抗性的寄主植物上的过敏反应。目前，这两类基因均得到了一些克隆，并且已在体外表达，其产物的性质和作用也得到了分析。植物中控制过敏反应的基因被认为是抗病基因，它的直接或间接产物存在于细胞膜上，能够识别病原物无毒基因或 *hrp* 基因的直接或间接产物，从而诱发过敏反应等别的防卫反应基因的表达。这种学说叫做激发子-受体学说。在非寄主植物上诱发过敏反应的基因（*hrp* 基因）在病原物中是成簇排列的，而在具有小种专化性抗性的寄主上引起过敏反应的无毒基因多是以单拷贝的或寡拷贝形式存在于病原物中。植物的抗病基因有的是单基因，有的是多基因。目前得到克隆的植物抗病基因有三个，一个是豌豆抗花叶病毒基因，另二个分别是玉米抗圆斑病基因和番茄抗叶斑病基因。它们都是单基因。

五、过敏反应与诱导抗性的关系及其利用评价

植物诱导抗病性是指植物受到外界物理的、化学的、或者生物的等因素侵袭时所产生的一种获得性抗性。这种抗性的产生涉及许多新基因的表达。目前已经发现有 9 簇基因与植物诱导抗性有关[8]。其中 5 个簇为 PR-蛋白基因，另外几个簇分别属于植保素合成酶基因簇，木质素合成酶基因簇，蛋白酶抑制剂基因簇，富含羟脯氨酸及甘氨酸的糖蛋白基因簇等。以上各基因家族也正是植物过敏反应发生后所能够诱导表达的。尽管也有人报道过敏反应不能够诱发植物的诱导抗性[9]，但只是个别的例子。这说明，植物诱导抗性可以由多种途径诱发，而过敏反应只是其中之一的有效途径，且并非是最佳途径。

根据以上对植物过敏反应发生的现象、机制、以及与诱导抗性之间的关系等的阐述，作者认为，植物诱导抗性利用可有多种途径，包括植物过敏反应途径和非过敏反应途径。基于前者，可以克隆病原物和寄主中过敏反应的控制基因，组合成嵌合基因拼接在植物受病菌侵袭时特异性诱导表达的启动子下，共同转移到植物中去，获得在受病菌感染时就能表达，产生过敏反应和诱导抗性的转基因植物；或者是单一地将病原中的过敏反应控制基因接在植物受特异诱导的启动子下面转移到植物中去，从而获得在病原入侵时也能发生过敏反应，产生诱导抗性的转基因植物。这就是过敏反应基因工程。基于后者，是在诱导抗性诱发时避免过敏反应的发生。其手段可以使植物或病原物的过敏反应控制基因失活。同时使用不能诱导过敏反应而能产生诱导抗性的诱导因子，如 *hrp*⁻、化学因子、物理因子等使植物获得诱导抗性。同时也可以使用基因工程的手段将防卫反应基因或其他对病原物有拮抗作用的基因接于受化学因子、病原物等特诱导的启动子下构成嵌合基因，转入受体植物，获得在一定条件下诱导表达抗性的转基因植物，从而在诱导抗性的利用上达到准确、快捷的效果。

参 考 文 献

[1] Klement, Z., Hypersensitivity. In: Phytopathogenic Prokaryotes, Vol. 2 (Mount, M. S., Lacy, G. C. eds.). New York: Academic Press, 1982, 149-177.

[2] Ross, A. F. Localized acquired resistance to plant virus infections in hypersensitive hosts. Virology, 1961, **14**: 329-339.

[3] Croft, K. P. C., Voisey, C. R., Slusarenko, A. J. Mechanism of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris*(L). inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Physiol. Mol. Plant Pathol., 1990, **36**: 49-62.

[4] Harper, S., Zewdie, N., Brown, I. R. et al. Histological, physiological and genetical studies of the responses of leaves and pods of *Phaseolus vulgaris* to three races of *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* and to *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. Physiol. Mol. Plant Pathol., 1987, **31**: 153-172.

[5] Sasser, M. Inhibition of antibacterial compounds of the hypersensitive reaction induced by *Pseudomonas pisi* in tobacco. Phytopathology, 1982, **72**: 1513-1517.

[6] Willis, D. K., Rich, J. J., Hrabak, E. M. *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. Mol. Plant-Microber Inte., 1992, **4**: 132-138.

[7] Keen, N. T., Dawson, W. O. Pathogen avirulence genes and elicitors of plant defense. In: Genes Involved in Plant Defense, Vol. 8. Plant Gene Research (Boller, T., Meins, F. eds.) New York: Springer-Verlag, 1992, 85-106.

[8] Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C. et al. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. Plant Cell, 1991, **3**: 1085-1094.

[9] Pennazio, S., Roggero, P. The hypersensitive reaction of soybean cultivars to tobacco necrosis virus does not induced systemic resistance but inhibits plant growth. J. Phytopathology, 1993, **138**: 118-124.

HYPERSENSITIVE REACTION AS RELATED TO INDUCED DISEASE RESISTANCE IN PLANTS

Xu Wenlian and Jiang Wuling

Occurrence of non-host and race-specific disease resistance in plants is often followed by plant cell rapid death at the invading sites of parasites within 24 hours; this phenomenon is called hypersensitive response (HR). It is a typical response of plant resistance against diseases, and is considered as an important mechanism of acquired disease resistance of plants owing to its ability of leading to the great increasing of phytoalexins which inhibite the further invasion to plant tissue by parasites. Yet acquired resistance of plants against diseases can also be induced by other factors which cause no HR definitly. So, the applicational method of acquired disease resistance of plants can be alternative. In this paper, the mechanisms, conditional factors, and controlling genes of HR are elucidated briefly, and the logical thoughts about the application methods of HR are argued.

植物抗病防卫反应的层次性和时序性

吕士恩　王　惠　董汉松

一、引　　言

任何植物都存在着抗病的潜能，也就是对付所有病原物的基因，能否被激活而表达及表达的程度，就决定着植物的抗病性表现，这是诱导抗病性的理论基础[1]。植物抗病机制包括预存性被动机制以及被病原物侵染和其他因子诱导后激发产生的主动防卫机制。在主动抗病性中，有两套基因先后起作用，即抗病基因和防卫基因。抗病基因对病原物无毒基因产物有识别作用，从而诱发防卫基因表达。防卫反应基因控制的是直接参加抵抗病原物的行动的分子和生物化学事件，分别叫做功能分子(functional molecule)和功能反应(functional response events)，两者合起来可称为防卫功能因子(functional defence elements)。这些功能分子诱导积累的速度和量、功能反应诱导发生的速度和程度(快慢和强弱)，也就是防卫反应基因表达的速度和程度，就决定着植物的反应表型即抗或感[2,4]。一种植物对一种病害的抗病表现(发病程度低或呈现免疫)是由这些防卫功能因子在植物-病原物互作的特定阶段实现最好组合的结果。这就是本文要讨论的植物抗病防卫反应的层次性(orderliness)和时序性(timeliness)。除了对这两个概念给予界定并举例支持这种界定外，我们在本文中不打算过深讨论有关防卫功能因子的详细情况，阐述这些内容是本书其他作者的任务。

二、防卫反应的层次性(orderliness)

1. 定义

防卫反应的层次性是指抗病防卫的功能因子的组成和它们有序发生作用的过程或特性。它有3层界定：①抗病防卫反应是由不同的功能因子组成的，包括功能分子和功能反应事件；②这些功能因子在抗病防卫反应中的出场有特定的秩序，主要是依据植物-病原物互作的阶段性，也就是病原物致病性与植物抗病性在机制上分阶段对抗(互作)的过程；③植物只有前一种防卫功能因子被病原物克服时，才动用下一个防卫功能因子。能帮助理解上述定义和界定的一个例子是棉花对枯萎病菌(*Fusarum oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)的抗性[3]：一是非寄主抗性(nonhost resistance)，病菌的侵染行为在产生侵入丝之前就被中止，研究认为根系分泌物对孢子的抑制作用显示为功能因子(可能更重要的是基本不亲和信号)；二是免疫，抵抗发生在病菌侵入表皮和皮层的过程；三是高、中抗病到感病，由寄主功能反应事件，包括植物保卫素、几种酶等的不同而决定。

2. 系统侵染的病害体系中防卫功能因子作用的层次性

(1) 侵染前阶段：从根部侵入维管束的病菌当接近植物根系时，遇到的第一道障碍就

是植物根系分泌物(root exudate)。棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)非寄主植物石亚系(*Gossypium arboreum*)的根系分泌物显著地抑制病菌孢子萌发,表明此根系分泌物中可能含有抑菌物质[3]。另外,根系分泌物还影响着根际微生物的种类。有研究报道,抗枯萎病棉花品种根际微生物群落中非病原真菌和放线菌种群数量显著大于感病品种。推测认为根际微生物的营养竞争和拮抗作用直接地影响着病原菌的数量和致病力,从而间接地参与了植物的抗病机制。

(2) 侵入(穿透)阶段:

1) 表皮和外皮层细胞壁的加厚和木质突的形成:表皮和外皮层细胞是病菌侵入到植物根维管束的必经之路。黄萎病菌(*Verticillium albo-atrum*)形成纤细的侵染丝接触到啤酒花幼根的表皮及外皮层细胞壁时,侵染点周围的细胞壁内侧沉积木质素等使细胞内壁加厚。在侵染菌丝的机械压力下,细胞壁内隐成为木质管(lignitube),这种木质管能有效地阻止病菌的侵入和扩展[5],Griffith 在豌豆黄萎病体系中也发现类似情况。Tallboy 已发现 13 科 42 种植物在黄萎病菌侵入时可产生木质突[5],由此表明表皮和皮层细胞是根部维管束系统病害中植物抗病的第二道屏障。

2) 内皮层细胞壁的木栓化(suberinization):病菌突破表皮和皮层细胞后常遇到的第三道障碍是内皮层。内皮层细胞壁的木栓化是一些维管束植物的特征之一。木栓化是积累木栓质的过程。木栓质是一类含有多酚的链状碳水化合物。Van Feel 认为木栓质可能的抗病机制是抵抗病原菌分泌的降解酶,机械地阻止病菌菌丝扩展,还可能具有抑菌物质等因素的作用[5]。

(3) 体内扩展阶段:

1) 维管束周围薄壁细胞内植物保卫素的积累:棉花中已知植物保卫素种类达 8 种之多,主要的是半棉酚、6-甲醚半棉酚、6-甲醚脱氧半棉酚等。当黄萎病菌接近棉花根部维管束时,植物保卫素在薄壁细胞中积累,Stipanovic 等用组织化学的方法证实,在接种 12—48 小时后,这些植物保卫素含量迅速增加[6]。

2) 筛板上胼胝质的积累:当病菌侵入筛管细胞后,筛管细胞的防卫反应之一是在筛板上有胼胝质(callose)的沉积。胼胝质是一种碳水化合物,它的沉积是对病菌的早期抗性反应[7]。胼胝质的快速形成与植物对维管束病原物的抗性有关[9]。番茄抗枯萎病品系 88-39在接种枯萎病菌 2 小时后,可见筛板中产生胼胝质,有胼胝质的筛板数也迅速增加,而感病品种体内产生胼胝质非常缓慢。

3) 导管中侵填体的产生:若病菌成功地突破木质管、穿过内皮层而到达导管,导管的防卫反应就变得尤为重要。导管中防卫反应的表现之一是形成侵填体(tylose)。侵填体是导管附近的薄壁细胞自纹孔处向导管或管胞内的膨大,上面有单宁、树脂等物质的积累,最后把整个细胞填塞,使导管失去输导水分的能力,同时也阻止了病菌菌丝和孢子的向上扩展。这是导管防卫反应的明显标志[10,11]。抗枯萎病的番茄品种在接种 3 天后,可见部分导管被侵填体阻塞,而感病品种导管中侵填体的形成受到抑制。接种 16 天后,抗病病株下胚轴区域 80%的导管产生侵填体,而感病品种仅有 20%左右[7]。表明侵填体的产生在抗病品种中快而多,它参与了植物的抗枯萎病机制。

三、防卫反应的时序性(timeliness)

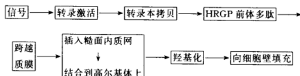
1. 定义

植物抗病防卫反应的时序性是指防卫功能因子按特定、有序的时间(先后)参与作用的过程或特性。它的表现有以下3种:①在植物-病原物互作的不同阶段所发生的防卫反应在各阶段之间有一个明显可分的时间跨度,如上文中所述,是一种“宏观”的时序性;②某个组成层次性的防卫功能因子参与抗病防卫反应时,从基因控制到它直接“投入战斗”直至植物的最终表现,也有一个时间先后的关系,是一种“微观”的时序性;③同属一个层次(如功能分子或功能反应事件)的防卫功能因子之间,以及这一层次的因子与另一层次的因子之间,也有一个谁先谁后的问题,可以叫防卫反应链中的时序性(timeliness in the responsive sequences)。说明以上3层关系并不简单,因为对许多功能因子的研究往往不是在同一个病害体系中进行的,关于各自的资料也是来自不同的病害体系,所以缺乏可比性。但可以举一个有助于理解所谓“防卫反应链中的时序性”的例子:一般说来,在同一个病害体系中,结构防卫反应如木质化、细胞壁加厚、乳突形成(属于本文界定的防卫功能反应事件)发生在前,然后紧接着以结构状态抵抗病原物功能分子,如富羟糖蛋白,第三环是其他功能分子,如病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins,PRP)、植物保卫素及参与防卫功能反应事件的各种酶系统。

下一步谈的是不同防卫功能因子参与植物抗病防卫反应所表现的时序性,列举了少数例子或提出主要表现,系统评述已在本书有关专题中给出。

2. 防卫功能因子发生作用的时序性

(1) 富羟糖蛋白:富含羟脯氨酸的糖-蛋白质复合体(hydroxyproline-rich glycoprotein,HRGP)作为一种功能分子,要经过诱发合成、跨膜和跨细胞器输送,最后沉积到植物细胞壁上,主要作为一种结构抗性因子抵御病原物的侵染。诱导刺激信号要作用于HRGP基因家族中对不同信号“分工负责”的区段(基因成员),这个基因成员被激活而表达,产生mRNA转录本,接下来才是翻译和HRGP蛋白质前体肽的合成;再接下来还要有糖组分联结(羟基化),最后才是向细胞壁的填充。这是一种严格的时序过程:

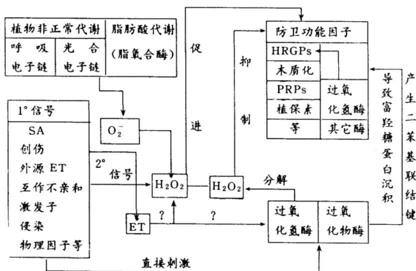


(2) 病程相关蛋白(PRP):酸性PRP从转录水平的诱发到前体跨膜输送的过程与HRGP类似,但它们最后是定位在细胞间隙,在翻译之后还有一个末端切除的加工过程;碱性PRP合成后定位在细胞内,也有一个从前体到成熟体的加工(王少华等:“PRP专题”)。

(3) 植物保卫素:植物保卫素(phytoalexins)是植物受到刺激(机械伤害、病菌侵入等)以后体内产生的微量抗生物质。现已报道在22科植物中有植物保卫素的存在。菜豆

素(phaseollin)是由菜豆产生的类萜类植物保卫素,用菜豆炭疽病菌(*Colletotrichum lindemuthianum*)的非亲和小种接种菜豆两天后,菜豆素达到高峰,非亲和小种的接种部位附近细胞迅速死亡,病菌不能再扩展繁殖;而用亲和小种接种直到5天后菜豆素才达到高峰,此时病菌已长满病部并形成孢子。由此可见,感病品种形成菜豆素的时间太迟,已失去抗扩展作用[12]。番茄受到病菌的侵染后体内酚类物质是重要的一类植物保卫素。抗病品种接上枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)后3天内酚类物质迅速合成,而感病品种酚类变化较慢。这表明,酚类物质的产生速度影响着抗病性的表现[13]。

(4)与H_2O_2作为二级信使有关的酶系统:H_2O_2在植物抗病防卫反应中作为二级信使的作用越来越受人们注意,它在植物接受诱导信号刺激后由植物细胞代射产生,已知的途径主要是由超氧化物歧化酶(superoxide dismutases,SOD)作用于O_2^-产生,产生后可刺激植物合成植物保卫素、HRGP、PRP等功能分子。梁元存等对此勾勒出一个从信号刺激到不同功能分子和功能反应事件的发生这样一种"防卫反应链中的时序性",如果把O_2^-的来源、其他二级信使如乙烯(ethylene,ET)、被广泛作为一级信号使用、也是抗病毒的二级信使的水杨酸(salicylic acid,SA)及植物抗病防卫的其他功能事件串联起来,一个更大的反应链就是:



在这个链中,除了我们熟悉的HRGP等功能分子的作用外,有两点需作说明:①SOD在链中产生二级信使H_2O_2的作用是它们清除活性氧和氧自由基的反应之一,对活性氧的清理是一个具有好、坏两种生理和病理功能的反应,而H_2O_2的二级信使作用具有更肯定的抗病防卫功能;②链环之间也存在正、反两种相互关系和反应的连续性,例如,过氧化氢酶分解H_2O_2的作用可以抑制这个二级信使的积累,但同时使植物组织形成有利于许多抗病反应的还原状态;过氧化物酶在具有后面这种功能即直接作为防卫功能因子起作用外,还促使HRGP与植物细胞壁多聚体的交叉联结。另外,从一个环节到另一个环节都有一个时间间隔,长短因病害体系而异(见本书其他作者的有关专题)。

这样一种大框架对理解植物抗病防卫反应发生的层次性和时序性极有启发，它可以引导人们根据病害体系的不同，寻找某种在特定阶段起关键作用的防卫功能因子。但到目前为止，还没有在任何一个病害体系中获得关于这个大框架的全部研究结果。

四、两个术语的联系和意义(兼结语)

以前人们谈到包括在上述 orderliness 和 timeliness 中的意义时，笼统地称之为"时序性(time sequence)"，而 spatial 与 temporal(时空)也时常被人使用，我们把它分开来讲，一个主要目的是为了帮助人们弄清抗病防卫反应在功能分子和功能事件、互作时间和地点(场所)上的联系与分界，从中寻找对某种病害体系来说起决定作用的功能因子(functional elements)和它在哪个环节上起关键作用。很明显，所谓层次性(orderliness)强调的是抗病防卫的功能因子的组成和它们按植物-病原物互作阶段有秩序地发挥抗病作用的规律，这个过程就是一个大的时序性；而对每种功能因子来说，时序性(timeliness)强调它们被诱导到发挥病理功能的时间先后，实质上这是从基因控制到生化表达的过程。

植物的抗病性的确存在非寄主抗性、不亲和抗性及诱导抗性等机制[13,14]，它们的区别是在抗病基因控制和运作机制上，而由防卫反应基因控制的防卫功能分子和功能反应事件对各种不同机制的抗病性都是相似的。在非亲和互作组合及经过诱导的植物上，几乎所有这些防卫功能因子都比亲和互作组合及未经诱导的植物被调动得速度快、程度高，这就是防卫反应层次性在互作亲和性分化和抗病性诱导中的主要意义。

参 考 文 献

[1] Kuc, J. Induced immunity to plant disease. Bioscience, 1982, **32**: 854—860.

[2] 王金生，寄主-病原物互作。植物病理学报，1992，**22**：289—291。

[3] 吕士恩，棉花根部几个生理因子与抗枯萎病关系的研究。见：植物抗性生理研究(赵可夫主编)。济南：山东科学技术出版社，1991，185—190。

[4] Kuc, J. Expression of latent mechanisms for resistance to blue mold and other diseases in tobacco. CORESTA Inf. Bull. 9th Tob. Sci. Cong. 1988, pp. 25—43.

[5] Beckman, C. B., Tallboys, P. W. Anatomy of resistance. In: Fungal Wilts Diseases of Plants (Mace, M. E., Bell, A. A. eds.). New York: Acad. Press, 1982, pp. 487—521.

[6] Bell, A. A. Biochemistry and physiology of resistance. In: Fungal Wilt Diseases of Plants (Mace, M. E., Bell, A. A. eds.). New York: Acad. Press, 1985, pp. 430—486.

[7] Vance, C. P. Cycloherximide treatments in plicate papilla formatioin in resistance of reed canarygrass to fungi. Phytopathol. 1976, **66**: 488—502.

[8] Beckman, C. B. Recognition and callose deposition in response to vascular infection in *Fusarium* wiltresistant or susceptible tomato plant. Physiol. Plant Pathol. 1982, **20**: 1—10.

[9] 刘　晖，番茄枯萎病和病理解剖研究。硕士论文，山东农业大学，1989。

[10] 高信曾，植物学。北京：人民教育出版社，1979，76—85。

[11] 米沙琦(王铨茂译)，植物-病原物互作的生物学和生物化学。武汉：湖北科学技术出版社，1985。

[12] 陈　熙，植物免疫学。上海：上海科学技术出版社，1989，136—149。

[13] Madamanchi, N. R., Kuc, J. Induced systemic resistance in plants. In: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals (Cole, G. T., Hoch, H. C. eds.). New York, London: Plenum Press, 1992, pp. 347—362.

[14] Hadwiger, L. A. Nonhost resistance in plant-fungal interactions. In: Molecular Signals in Plant-Microbe Communications (Verma, D. P. S. ed.). Boca Ration: CRC Press, 1992, pp. 85—96.

ORDERLINESS NAD TIMELINESS IN EXPRESSION OF DISEASE RESISTANCE IN PLANTS

Lu Shien, Wang Hui and Dong Hansong

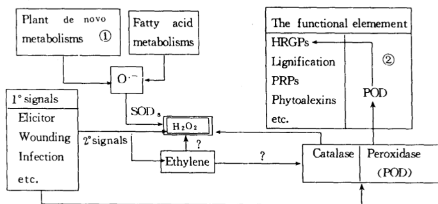
It is well established that the presence or absence or genetic information for resistance mechanisms be not prerequisite determinants of disease resistance in plants, and that phenotypical accomplishment and its degree of the resistance be dependent on the speed and magnitude with which genetic information for resistance is activated to express (Kuc, 1988; Madamanchi and Kuc, 1992). If without regards to the genetic control and expression regulation in relatioin with heredity for different types of resistance, such as nonhost, and constitutive, incompatible, and induced resistance, accomplishment and achievement of plant resistance are functionally similar. All species of plants can use similar functional molecules and functional response events for disease defence. Such functional molecules and response events can be together called "functional defense elements" which are implicated in actions directly countering or fighting pathogens. Usually, they come into their functions following the so-called orderliness and timeliness, for which as terminology a convenient explanation is that plants mobilize their resistant responses in a highly ordered sequence and will put the next element to use only when the former fails to resist pathogens, and that plants become impaired by diseases only if all of the functiona defense elements loss their roles to overcome pathogenicity by pathogens. Thus, resistance of cotton to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* expresses as nonhost resistance in *Gossypium arboreum* in which the pathogen fails to penetrate the root epiderms and the root exudates show inhibition to sproe germination of the fungus, immunity (completely resistant) which is mainly contributed by structural factors from the root epiderms to cortical cells, and varying extent resistances which are dependent on degree of the functional elements and their integrated effects (Lu, 1991).

The orderliness is defined as components of the functional defence elements and their action sequence in plant resistance to diseases. For pathosystems of root-inavsion and systemic infection by pathogens, the orderliness is showed at three stages. First, at preinfection stage, root exudates are seemed responsible for impeding growth of pathogen suggested by the inhibition. Secondly, during penetration by pathogens through root epiderms and cortical areas, the responsive events mobilized by hosts include lignification, lignitube formation, and subrinization, *etc*. At the third stage, when pathogens have entered into the vascular elements, host plants can put various biochemical factors

to use, mainly including production of callose and tylose, and synthesis of phytoalexins.

The timeliness tells that the fuctional molecules and response events take their roles in the disease defences at a highly time-schematized sequences. It is not only expressed in the above orderliness-characterized stages of plant-pathogen interactions, but also followed by every individual functional factors. This is well known in the elicitation and accumulation of HRGPs, PRPs and phytoalexins, as well as in several enzyme systems related to functions of H_2O_2 as a sceondary messenger for elicitation of the defence functional elements, such as H_2O_2/catalase, peroxidate/peroxidase and O_2^-/superoxide dismutase. For the three functional molecules, three aspects are involved in the timeliness. First, there are usually time intervals from their gene activation and transcription to accumalation of the molecules. Secondly, a special time sequence exists not only between emergences of these molucules, but also between their "coming on" and other functional events such as lignification. Lastly, the most defence-significant timelienss is between compatibility and incompatibility of plant-pathogen interactions, and between immunized and untreated plants in a given pathosystem. We use a separate section to talk about the orderliness and timeliness expressed by compatibility differentiation of plant-pathogen interactions, and try to make a comprehensive understanding to the two terms, for which the other usual description are the "spatial and temporal dynamics". The critical point can be briefly described as follows: in the compatible interactions or plants which have not been immunized before challenge inoculation, the plants mobilize the functional responsese too late to restrict the early behavious of infection by pathogens.

If making a comparison, we can say that the orderliness mainly implicates composition of the functional elements and the timeliness mainly time order of these elements to "come on", and that they are involved each other to form a orderliness and timeliness chain (sequence) such as the follows:



① The O^- can be produced from inormal electron transmission chains in both respiration and photosynthesis.

② POD can result in cross-linking cell wall polymers by catalyzing the formatioin of biphenyl cross-linkages (Madamanchi and Kuc, 1992).

As conclusions, when the induced resistance is tried to apply for plant disease control, enhancing a special defense factor at a critical stage of plant-pathogen interactions is believed to be important. This is why the so-called orderliness and timeliness are so detailed.

激发子:病理功能、工作模式、信号传导、遗传运作

潘　军　董汉松　刘爱新

一、前　　言

激发子(elicitor)的概念最初指病原真菌的非亲和小种诱导寄主植物合成植物保卫素的小分子化合物[1],现泛指任何来自病原物、寄主植物、非病原物、非寄主植物的能够诱发植物任何抗病防卫反应的物质。该物质有外源激发子和内源激发子之分,前者指人工施加的、作为最初诱导物使用的分子,大多经特殊制备获得;后者是在植物-病原物互作过程中产生的,主要是作为病程相关蛋白(PRP)的β-1,3-葡聚糖酶和几丁质酶分解病原物或(和)植物细胞壁产生的低聚糖。所以,外源和内源激发子也可以分别叫一级和二级(或次级)激发子。就诱发植物抗病防卫反应的功能来看,许多非生物来源的化合物,如乙烯、水杨酸等,以及某些金属离子,如 Ca^{2+}、Mg^{2+} 等,也可以担当激发子所具有的功能,同时也有外源和内源之分。有人把这些因子叫非生物激发子,对应于通常意义上的激发子,即生物激发子。另外,一些物理刺激,如紫外线照射、创伤、热振荡等也可以诱导植物的多种抗病防卫反应。目前,对激发子的研究热点是它们在植物抗病防卫"链-环"反应中引导的信号传导和接受这种信号刺激的植物防卫反应基因的激活和表达调控,这也是了解植物诱导抗性机制的关键。

本文讨论激发子的性质、类别、工作过程、病理功能及分子生物学方面,重点放在激发子的工作模式、信号传导以及基因对基因关系方面的研究进展。由于生物激发子、非生物激发子和物理刺激因子往往被使用在同一个病害体系中,它们诱导的植物反应存在密切联系,本文也将适当涉及后两类因子。

二、激发因子的种类和性质

1. 植物和真菌来源的激发子

即通常意义上的激发子。植物病理学家和生物化学家最初所指的激发子概念有明显不同。前者通常使用病原物、特别是真菌的扩散性(可溶性)分子,一般由液体培养提取获得;后者主要是用从植物或病原物,特别是真菌细胞壁制备激发子。在植物病理学家的这种界定中,激发子最初受它在植保素诱导合成中的局限,本身作为一个单独的因子参与植物-病原物互作。在生物化学家那里,激发子的功能成分是固定、即结合在细胞壁上的,在一个活的互作体系中、即自然条件下,它的作用实际上是我们所说的二级(次级)激发子,必须使其从细胞壁上释放出来。也就是说,植物病理学家考察的是自然过程,当他们发现一级激发子之后还有一个信号传导过程时,就与生物化学家所期望了解的联系起来:生物化学家把激发子引导的信号传导提前了一步,但这一步在自然界的互作体系中是不能发

生的，必须由一级激发子或刺激因子诱发。对以上所说，读者将会从下面的讨论中获得明确印象。

生物激发子有多种植物和微生物来源，按性质大致分3类[2]：一是真菌或植物细胞壁的多糖成分，二是它们表面的脂类化合物，通常都是由细胞壁粗提物经复杂的化学和生化方法处理后得到。第三类是真菌和细菌分泌的多肽，包括能够释放具有激发子功能的低聚糖的糖基水解酶。当用病原真菌的培养液制备激发子时，激发子成分主要有低聚糖、糖蛋白、低肽等，都是扩散性的。

从植物和真菌细胞壁制备的低聚糖激发子是最典型的一类，对它们生物化学的研究包括一套复杂的程序[2]。①激发子的制备：包括从植物或真菌分离细胞壁、化学处理释放低聚糖激发子提取物、不同色谱处理纯化不同性质的激发子等，均以所要制备的激发子的性质（如葡萄糖苷或半乳聚糖等）而使用不同的化学和生化处理方法。②激发子组分和功能基团分析：包括糖残基和糖苷键的数量、联结方式的分析、分子量的测定等，要使用各自不同的气、液色谱和其他生化分析法。③激发子生物功能测定：依植物-病原物体系不同而有不同的测定程序和指标，通常需要借助免疫化学、放射化学等方法追踪激发子在植物体内作用的动态。当激发子制备物来自真菌的培养液时，上面后两项也是一个完整研究体系必须遵循的。

内源或次级激发子可以由诱导产生的植物酶，主要的如β-1，3-葡聚糖酶和几丁质酶分解真菌或植物细胞壁产生。与水杨酸等二级信使不同，这种内源激发子被认为仍然以激发子-受体分子识别方式起作用。在烟草赤星病中，一个初步构建的双向激发子-受体分子互作模型认为，这种次级激发子与一级激发子是一种接力关系，并引导下一步的信号传导；担当一级激发子功能的有病菌细胞壁成分、非病原细菌的脂多糖（LPS）和胞外多糖（EPS）。

目前已在不同的植物-病原物互作体系中使用了不同的激发子；诱导的植物抗病反应也多种多样，表1举了一些例子。

表1　真菌来源的激发子举例

Table 1　Examples of fungal elicitors

激　发　子	来　　源	诱发的反应	参考文献
糖蛋白 Pgt-elicitor	小麦茎杆锈病病菌的菌丝细胞壁	诱导一种类似于过敏性的反应	[4]
蛋白质 elicitins	在人工培养条件下由 *Phytophthora* 真菌分泌的蛋白质	引起非寄主烟草叶片接种部位坏死	[5]
蛋白质 Ap-elicitor	大理菊轮枝菌	诱导植保素的形成	[6]
7-β-葡萄糖苷 elicitor	*Phytophthora infestans*	诱导植保素的形成	[7]
葡聚糖 elicitor	*Phytophthora megasperma*	可以诱发 glyceollin 的合成	[8]
脱乙酰壳多糖 elicitor	*Fusarium solani*	诱导豌豆素的合成	[8]
糖蛋白 elicitor	*Phaseolus vulgaris*	诱导接种部位的组织褐变及植保素积累	[9]
激动素 elicitor	*Vanilla planifolia* 细胞的悬浮培养液	诱导4-羟基-3-甲基氨基苯酸的形成	[10]

2. 病原细菌的激发子

在植物-病原细菌非亲和互作中，激发子引发的最终表型是植物的过敏反应（HR）。人们假设这是植物抗病基因（R）与细菌无毒基因（*avr*）或（和）致病-过敏反应基因（*hrp*）产物识别的结果，但研究状况是[3]：①植物的 R 基因无一得到鉴定，作为识别分子的产物也未知；②对 *avr* 和 *hrp* 已有大量克隆、鉴定及转化表达等研究，但其一级产物都不具有诱导 HR 的能力。Harpin 的发现被认为找到了细菌诱导 HR 的激发子的范例。这是中国留学生在美国康乃尔大学做博士后期间进行的研究。从火疫病菌 *Erwinia amylovora* 中分离出来的这种引发植物 HR 的蛋白质类型的激发子 harpin，是一种酸性、热稳定性的胞外蛋白质，分子量为 44kDa。Harpin 能够引起烟草细胞悬浮培养液滤液的 pH 值的升高以及引起烟草叶片薄壁组织的萎蔫。

细菌的几种多糖，包括脂多糖（LPS）和胞外多糖（EPS 或 CPS）[11]，人工用作诱导物时也显示激发子功能，但它们都不是基因的一级产物，人们通常并不把它们列入 R 基因对 *avr*（或 *dsp*）基因互作的范畴。

3. 非生物激发子和物理刺激因子

作为植物抗病性诱导因子使用的化学物质各种各样，物理胁迫或刺激也是常用的手段（表 2）。

表 2　诱发植物抗病反应的非生物因子举例

Table 2　Some abiotic factors with roles of inducing plant disease defence

因　子	研究的植物	诱发的反应	参考文献
紫外线	水稻叶片	诱导合成植保素前体	[10]
创　伤	大　豆	诱导类倍半萜植保素的生物合成	[12]
钒酸盐 (Vanadate)	蕨类植物	诱导倍半萜烯的组成成分 1,4-dimethylazulene 产出率的增加	[13]
乙　烯	烟　草	能快速诱导碱性类型的 PR-1 转录本的积累	[14]
创　伤	马铃薯块茎	诱导编码 HRGP 的 cDNA 的升高	[12]

三、病理功能

激发子诱发的植物抗病防卫反应是多方面的，有以下共同表现：①可以诱发结构的防卫反应、防卫反应的功能分子和防卫反应的功能事件，统称防卫反应功能因子；②这些功能因子在植物-病原物互作中的发生遵循层次性和时序性，并非在同一个病害体系中都发生；③在一级激发子刺激植物之后，还必须有一个信号传导过程承接，这是一个复杂的、被称为防卫"链-环"的反应过程。对激发子诱导的功能因子，其他作者已有讨论，我们在此只简单陈述，目的是对激发子作为上述"链-环"反应首端的作用到功能因子的诱导给出一个总体概念。

1. 诱导的结构防卫因子

有多种类型，是通过不同的酶和生化过程的诱导实现的（见本书徐文联、王金生："植

物诱导性抗病因子”)。

2. 诱发的防卫反应功能分子

包括病程相关蛋白(PRP)、富羟糖蛋白(HRGP)、植物保卫素等。表3略举几例,本书其他作者对此已有详述。

3. 诱发的防卫反应功能事件

最受注意的是除HRGP作为一种因子外的细胞壁强化过程,要调动多种酶,如:过氧化物酶(POD),参与由香豆酸、阿魏酸、芥子酸等芳香族化合物联结成木质素等大分子的过程,还参与这些大分子与HRGP的交叉联结[15,16];苯丙氨酸氨裂解酶(PAL),除了参与异黄酮类植保素的合成,还催化苯丙氨酸转化为木质素前体之一的肉桂酸。另一类事件是具有特定功能的酶的诱发,如:查尔酮合成酶(CHS)等系列酶[11,17],也参与异黄酮类植保素合成;超氧化物歧化酶(SOD),在参与自由基和活性氧消除的同时,产生被公认为次级信使的H_2O_2。激发子对这些酶的诱发同样有一个反应过程,包括信号传导、酶基因活化和产物最终形成。

表3 诱导主要功能分子的激发子举例

Table 3 Examples of elicitors inducing the functional defence molecules(FDMs)

功能分子	互作体系	激发子	参考文献
植保素	大豆-炭疽菌	7-β-葡糖苷	[7]
	水稻-镰刀菌	病原菌培养液制备物	[10]
	烟草-TMV	TMV侵染	[2]
PRP	马铃薯-疫霉(晚疫)	*P. infestans* 的糖蛋白等	[2]
HRGP	甜瓜-炭疽菌	*Colletotrichum lagenarium* 的糖蛋白等	[2]

四、工作模式

目前提出的关于激发子参与作用或有关的基本模式主要有激发子-受体模式、二聚体模式、离子通道防卫模式,其中激发子-受体模式最初是针对*Phytophthora*诱导的防卫反应而提出的,有两种“变型”,即激发子/抑制子-受体三因子模式和激发子-增强子/抑制子-受体四因子模式。董汉松、刘爱新列举了不同模式的代表体系(见本书“植物诱导抗性的进化论和遗传学基础”),本文下面主要是综合介绍并对这一概念进一步加以阐述。

1. 激发子-受体分子识别模式(elicitor-receptor model)

最初由Albersheim和Anderson-Prouty[18]提出,要义是:激发子与寄主细胞上它的受体分子间的分子识别是启动植保素合成的第一步。与原定义相比,这是一个被扩充的概念(参见文献[18]),因为此模型形成于70年代中期,初界定时不可能包括后来发现的次级信使传导的因素。现在的要义包括两种情况:①激发子-受体分子识别直接诱发功能分子(主要是植保素),这需要受体分子直接与植物核基因的诱发相联;②在这种分子识别后还需要次级信使,这主要是当受体分子位于核外因子(如细胞膜)上的时候。原概念的基本

界定也很重要：激发子与受体分子需要结构互补，形成的二聚体本身可以决定互作的非亲和反应。以下介绍对这一模式的研究例子和过程。

许多科学家认为在上述两种情况下，受体分子的位置和性质需要与基因转录的激活相联系。考虑到一些激发子分子的大小，受体应一般位于细胞表面的原生质膜内。Yoshikawa 等[19]使用^{3}H 真菌昆布多糖（mycolaminarin），即激发植保素合成的 1，3-β-葡聚糖激发子来确定受体在大豆中的位置，结合点被发现位于膜部分，特别是在原生质膜上更加丰富；这种结合能够被链霉蛋白酶对膜的 预先处理所阻止。他们得出结论：蛋白质类型的受体位于原生质膜上。Cosio 等[20]的研究也证实了这一点，他们使用从 *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* 分离出来的葡聚糖部分，以^{125}I 的同位素标记证实了激发子联结在原生质膜上。这种结合是可饱和的和可逆的，结合能力与诱导 glyceollin 积累的能力呈正相关关系。

而 Hadwiger 等人[21]的发现与上面的结果相反。他们证实一种外源的脱乙酰壳多糖激发子，也就是从真菌 *Fusarium solani* 中纯化出来的胞壁成分，在对豌豆细胞处理 20 分钟以后，这种激发子能够在细胞质内被发现。这就证实了一种不同形式的信号传导系统，即激发子穿过了原生质膜与内源受体进行了结合。这种研究很少进行，但很有意义：一个激发子分子能够从细胞质中被重新分离出来并且在结构和功能上显示出与最初处理时一致的，而不是最初的激发子的降解物，就是说该激发子在与原生质膜上的受体互作后已经变成内源激发子。同时，还存在这种可能，即一个外源的激发子即使在与受体的互作中发生结构改变而成为内源激发子。许多激发子被证实是碳水化合物或者含有碳水化合物成分，并且碳水化合物中的糖残基显示为活性基团。另一种情况是激发子由内源产生：植物细胞中含有许多水解酶，可以作用于细胞壁而降解产生低聚糖或多糖分子[22]。因此，与受体发生作用的激发子的活性成分也许是最初处理的激发子的降解部分，外部刺激是通过诱导这类酶起作用的。

激发子的活性成分进入细胞说明了内源受体的存在。Kendra 等人（1987）已经证实脱乙酰壳多糖激发子与 DNA 有一种直接作用关系。他们发现，激发作用的发生直接改变了染色质中的 DNA，因此提出激发子与 DNA 直接的互作可以解释许多不同的激发子对防卫相关基因组的激活作用。但并未证实这种激发子与 DNA 片段直接联结，这是很难想象的，即使是次级信号，也不是直接联结到基因上（见下文）。

2. 激发子/抑制子-受体分子识别模式

（1）三因子互作的含义和实验证据：这是激发子-受体分子模式的变型，是为二因子模型不能决定小种专化性的现象提出的，用来解释小种专化性的原因[23]。同一体系中的激发子可以不止一种，其中有的激发子的诱导作用具有小种专化性，但在有的体系中，亲和与非亲和的小种都能够产生激发子，小种专化性是由抑制子所决定的。

来自 *P. infestans* 亲和性小种的菌丝的可溶性部分可以抑制马铃薯切片的 HR 和植保素的产生，而从非亲合小种中出来的物质其抑制作用很小。水溶性部分的成分包括 17—23 碳 β(1→3)和 β(1→6)-连接的葡糖单位。Doke 等[24]认为葡聚糖在马铃薯-*P. infestans* 互作中对决定专化性发挥了重要作用。Maniara 等[25]从该菌游动孢子和孢子培养液中鉴定的抑制子是 17—23 碳的低聚糖，以 β→1，3 和 β→1，6 链联结，可以抑制激发子对

HR 型局部坏死的发生和倍半萜类植保素的积累。

在其他体系中也发现了抑制子。Storti 等人[26]报道在西红柿中由 *P. infestans* 的产孢结构释放的而不是由菌丝释放的物质能够抑制 HR 和植保素的产生。豌豆的病原菌，*Mysosphaerello pinodes*，可以分泌大豆植保素生物合成的激发子和抑制子。激发子被证实是培养液中高分子量的部分，是一种多糖。而两种抑制子被证实是低分子量的那一部分，分别叫 F_2 和 F_5；这两种抑制子都可以和茚三酮发生染色反应，F_5 比 F_2 有更强的活性。F_5 含有丝氨酸、天门冬氨酸和赖氨酸，其比率为 2∶1∶1。用蛋白质裂解酶处理 F_5 可以降低其活性，说明肽是构成 F_5 分子 的一个必要的成分。只有在 F_5 存在时，非病原真菌和病菌的亲和小种才能在豌豆的叶片上建立侵染。在这些病原菌中，*Alternaria alternata* 15B，一种从菜豆病原真菌中分离出来的无毒种类，以及 *Stemphylium sarcinae forme*，在 F_5 处理叶片两周以后能够侵染豌豆并且形成孢子。另外，*A. alternata* 15B 可侵染 5 种豆科植物，在 F_5 存在时 *M. pinodes* 也能成为致病菌；而 15B 并不能在其他的植物种类上建立侵染。也就是说，产生 F_5 的 *M. pinodes* 的寄主专化性完全与 F_5 的生物活性的专化性相一致。

F_5 对菜豆的叶片、茎、分离的子叶原生质体不引起任何可见的伤害，它也几乎不是一种"寄主专化性毒素"。动力学分析显示抑制子的作用机制与激发子并不是竞争性的，这一点与从大豆病原菌 *Ascochyto rabiei* 上分离出的抑制子是一致的。

从 *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* 地培养液中分离出的一种聚甘露糖蛋白，可以抑制由同种真菌的激发子所诱导的 glyceollin 的积累。这也是一种具有小种专化性的抑制作用。

（2）抑制子的作用机制：有两种可能，一是与激发子竞争作用位点；二是通过代谢抑制干扰激发子的活性。

第一种机制在番茄几种酶的诱导中已有验证。番茄对乙烯刺激所发生的应激反应的早期症状，可以被用来鉴定从酵母中提纯的一种激发子的活性。这种激发子制备物是糖肽类，可以诱导乙烯及苯丙氨酸氨裂解酶的生物合成。这种激发子的活性可为链霉蛋白酶处理而受到部分抑制，而被内-β-N-乙酰氨基葡糖苷酶 H（endo-β-N-acetylglucosaminidase H，endo-AGSdase H）、α-甘露糖苷酶（α-mannodsidase）或者高碘酸处理完全抑制。endo-AGSdaseH 的作用是释放一种低聚糖，它们完全抑制糖肽激发子的作用；同时，高碘酸氧化作用和 α-甘露糖苷酶又可以抑制该抑制子的活性。抑制子有四种活性组分，含 7－10 个单糖、活性部分都主要由甘露糖组成，同时含有 N-乙酰氨基葡糖苷和葡聚糖。它们对来自 *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* 的细胞壁的不同激发子不具抑制作用。这些结果说明：抑制子的作用与激发子功能基团的性质有关，低聚糖抑制子只是专一性地对某一种激发子发生作用。进一步推论是：抑制子是连接在某个识别位点上的，并不产生信号，仅仅阻止相应的激发子诱导应激反应的活性[27]。

第二种机制见于 *P. infestans* 诱导马铃薯产生倍半萜类植保素的过程，双链化 AA 和 EPA 激发子活性的抑制子是 17－23 碳的葡聚糖，它通过抑制脂氧合酶（LIXase）而阻止 AA 和 EPA 的双链化[11]。另一项研究结果表明抑制子的作用还可以通过另一种代谢调节实现。来自 *M. pinodes* 的抑制子通过阻止酶的磷酸化介体的形成而抑制原生质膜上 ATP 酶的活性。由于抑制子能够抑制大豆叶片上的激发子溶液的 pH 值的下降，那么抑制子可通过阻塞菜豆原生质膜上的 ATP 酶的质子泵而发生作用。在菜豆叶片中，抑制子的这种

抑制活性是短暂的，在处理以后2—3小时就会消失。

3. 抑制子-增强子/激发子-受体分子互作

在有上述激发子-受体（二因子）、激发子/抑制子-受体（三因子）互作的体系中，病原物产生的激发子不止一类，有的激发子的作用是专化性的，只能由非亲和小种产生，按二因子模式决定非亲和互作。有些激发子不具小种专化性，亲和与非亲和的病菌小种都可以产生，互作的专化性是由亲和种的抑制子决定的。随后或同时发现了另一种更复杂的情况，即抑制子-增强子/激发子-受体分子四因子互作，它的运行机制应该是：①在没有抑制子的情况下，增强子（enhancer）是激发子与受体分子的中介，其作用应该是可以想象的。它与激发子的结合有利于激发子运向受体分子部位，此后增强子退出分子互作。②在出现三因子互作后，当抑制子与激发子竞争植物细胞上的受全位点时，增强子或中和（结合）抑制子，或与受体位点结合而等待激发子到达，即保护受体位点不被抑制子占据。③当抑制子是通过代谢（如上述LIXase和ATP酶）而抑制激发子活性时，这种代谢中的酶自然就成为增强子的作用目标。情况之所以复杂，是因为这种二因子、三因子和四因子互作可以发生在同一个互作体系中。如在马铃薯-*P. infestans*互作体系中，Maniara等[2]在研究抑制子时发现了这种增强子，也是低聚糖。对这种情况更确切的说明是，激发子-受体互作基本模式的作用受众多结构类似的小分子的影响，这种影响有正向和反向的，可以发生在同一个互作体系，但不一定发生在这个体系的同一个互作组合的同一个互作阶段，否则，它们产生的量和速度就是影响激发子-受体分子互作的关键因素。

某些化学物质显示出“增强子”的作用，草酸是一个例子。在棉花细胞中，它能与*Verticillium dahliae*激发子的作用结合，使激发子对植保素的诱导能力增强10倍。在无草酸时，激发子的诱导效应很低。草酸能够增强激发 子能力的量对棉花无任何负作用[28]。这个例子的意义并不在于表明草酸是一种真正的增强子，但结果暗示在这个互作体系中可能存在与草酸结构类似的这种真正的增强子。

4. 二聚体模式（dimer model）

激发子-受体模式的一个主要特点是把分子识别的关键部分指定为糖残基联结基团，因为糖不是基因的一级产物，所以该模式很难从基因对基因关系加以理解；同时，这一模式还不能解释亲和互作的发生机制。针对这些弱点，Ellingboe提出了二聚体模式[29]，要义是：植物R基因的产物与病原物*avr*产物之间结合成二聚体，即蛋白质对蛋白质分子识别，这种二聚体的形成是基因对基因非亲和互作的因子之一，但不是唯一因子，它必须与其他代射或互作因素相结合，其中最重要的是“基本亲和性”的瓦解（disruption）。很明显，该模式并不把非亲合互作归因于植物的主动防卫反应，企图包容防卫机制的不同层面。这种多容性的企图也恰恰是它的弱点，因为“基本亲和性”是近年提出的界定最不明确、也是使用最混乱的一个术语，里面至少包含从最初的识别到包括病原物致病酶在内的因子，这就把一个本来为了解释抗病防卫反应最初引发机制的设想陷入到防止卫反应功能因子中，也就是层次性上有问题。同时，我们注意到人们，尤其是中文作者在引用这个模式时，多数提出R-*avr*基因产物识别的内容。但模型的意义也就在于基因对基因产物互作，这是在激发子之后并已经经过了信号传导引发的事件。

五、工作过程:信号传导

许多研究指出,控制防卫反应功能因子的基因转录作用的激活,发生在植物对激发子和其他刺激发生感应以后整个作用过程的较晚的时期。公认在外源激发子之后,必须有一个在互作体系内部(植物体内)释放的内源激发子,此内源激发子的功能是以激发子-受体分子识别方式把初级信号扩散到植物不同部位,激活那里的二级(次级)信使,次级信使再把信号传递给基因的靶序(target sequence,TS);在次级信使和 TS 之间,可能也不是直接的关系。整个过程是:一级(外源)激发子→二级(内源)激发子→二级信使→TS→基因活化→抗病防卫的功能因子。但已有的研究表明,并非所有的信号传递都遵循这一程式,总的来看,大致可按信号直接传导、水杨酸类型需植物受体分子介导的传导、环腺苷磷酸化途径传导和离子通道调节的传导等范畴来理解。需提醒的是,以前还没有对信号传导范畴和类型的归纳,所以下面的讨论,我们没有把握认为是对信号传导类型的界定。

1. 直接传导

在除 *Phytophthora nicotianae* 外的所有侵染烟草的疫霉菌中发现的一类激发子,是到目前为止唯一靠自身在植物体内传导并引发 HR 的例子。这是一种蛋白质,叫 elicitin,可由病菌在培养条件下分泌。用放射性标记追踪证明 elicitin 有如下活动规律[5]:①从茎秆中的受体部位向它们直接发生作用的叶片移动;②在不引发任何分子变化的情况下到达它们的目标;③以同样的速率在木质部液流中被转运;④不改变木质部的流动速率,尽管它们对层状体能引发急剧的变化。因而,elicitin 通过远距离传导而导致局部坏死的活性看来并不需要任何其他可移动的植物二级激发子和次级信使。

2. 由受体蛋白质介导的信号运转

水杨酸(SA)作为二级信使对烟草和黄瓜抗病毒的作用得到广泛重视,创伤、植物和真菌来源的激发子等诱导处理,可使体内 SA 的含量增高 10—100 倍,这种量的增高与寄主抗病毒能力或 HR 的发生相伴随[30]。在 NN(对 TMV 发生 HR 的显性基因)型香料烟上,SA 的诱导增加与 PRP 及烟草的 HR 呈一致关系,而在 nn(隐性基因)型香料烟上不存在这种相关性[31]。Chen 等[32]鉴定出一种胞间蛋白质,分子量 650kDa,可以联结 SA。这种 SA-受体蛋白分子联结在 3 方面显示为 SA 作为二级信使传导的一个步骤。①它在植物体受诱导后含量比较高,可达 5pmol/mg(蛋白质);同时,它结合 SA 的 KD 系数为 14μm,也就是说,这种蛋白质不仅在量上与 SA 的诱导增加相一致,而且与 SA 有很高的亲和性。人们以前推断的葡聚糖受体分子在诱导后的寄主体内含量只有 1.3pmol/mg(质膜)。②SA-受体蛋白分子联结受蛋白酶、SA 结构类似物抑制,这后两类物质的抑制作用与它们诱导 PR 基因表达的能力相一致,而不能诱导 PR 基因的 SA 的类似物不具有与 SA 竞争结合蛋白质受体的能力。③SA 受体蛋白结合受外加的 SA 抑制,说明它们不是一种酶和底物关系,在酶的负反馈调节中,起抑制作用的是酶解产物。

这种 SA-受体蛋白联结所起的作用至少是把 SA 从植物受侵染或刺激的位点转运到其他未受侵染的部分[31],也就是说,作为 SA 二级信使传导的一种形式起作用。因为这种

SA 结合蛋白是从细胞间隙分离的[32]，所以 SA-蛋白分子联结后还要经过一段跨膜传导和对包括 PR 基因在内的有关 TS 的活化刺激，虽然可以设想出种种机制，例如 SA-受体蛋白运转到目标部位（植物抵抗病毒或受病毒再侵染的部位）后重新释放 SA，SA 再以内源激发子的形式继续信号传导过程，但仍需获得实验证据。

由受体蛋白介导的信号传导的另一种形式或例子发生在大豆细胞抗病防卫反应的诱发过程中，这是一种可以结合促性腺激素（GTP）的蛋白质。Legendre 等（1992）[33]对此作了研究和推论。首先，在植物和动物中，用抗体-生物素-抗原标记传送技术（Fab），可以把专化性识别 GTP 的结合蛋白传送到大豆细胞中，使大豆素激发子诱导的快速的氧化裂解增强 10 倍，而细胞内的热变性的配体以及非相关的蛋白质不受影响。抗体在大豆细胞中识别一种分子量约 45kDa 的蛋白质，这种蛋白质可以通过 GTP-8-S-鸟嘌呤 5'-O-硫代三磷酸（thiotriphosphate）防止 ADP-核糖基化作用。因此，45kDa 的这个 GTP 结合蛋白对氧化裂解作用的诱导是一个关键因子。第三，在大豆细胞中发现了一种 GTP 结合蛋白的专一性的激活剂叫 mastoparan，它在不加激发子刺激时也可以诱导与防卫相关的氧化裂解。最后，霍乱毒素的 A 亚基也是一种 GTP 结合蛋白的激活剂，它能够微弱地增强激发子诱导的氧化裂解作用。以上这些事实说明，GTP 结合蛋白参与了大豆细胞中激发子的信号传导过程。

3. 经环腺苷磷酸化途径的传导

在植保素诱导合成中，信号传导被证明可以借助环腺苷磷酸化而发生。在用 *Verticillium albo-atrum* 激发子处理的胡萝卜细胞中，环腺苷酸（cAMP）有一个很大的升高，并在处理 30 分钟后达到最高值。在苜蓿悬浮培养的细胞中，放射免疫测定表明 cAMP 的浓度可达到 0.5pmol/g（细胞鲜重）。用来自 *V. albo-atrum* 培养的激发子处理后，cAMP 浓度增加 5 倍，并且增加速度很快但很短暂，处理后 4 分钟达到最高值，7 分钟后又恢复到最初的水平。

cAMP 合成酶（腺苷酸环化酶）与降解酶（二氧磷基二酯酶）的反应对于激发子的处理与 cAMP 一样，在真菌激发子与苜蓿的植保素诱导合成之间充当了第二信使的作用。苜蓿细胞受激发子处理后，腺苷酸环化酶有一个短暂而迅速的提高，其动力学特性与 cAMP 浓度的变化相类似。二氧磷基三酯酶的活性在激发子处理后也有一个很大的提高，但时间上要比腺苷酸环化酶晚，在激发子处理后 90 分钟才开始升高，几个小时之后又恢复到最初的水平。除了 cAMP 系统与激发子处理有以上关系之外，cAMP 对植保素的合成和 PAL 的活性也有一种直接的影响。在不加真菌激发子的苜蓿细胞悬浮培养液中，二丁酰 cAMP，cAMP 的一种结构类似物可以穿过质膜诱导 PAL 活性增加到原来的 5 倍，在这同时还伴随着植保素的积累[34]。用二丁酰 cAMP 或霍乱毒素（一种腺苷酸环化酶的激动素，能够导致细胞间的 cAMP 浓度的升高）处理胡萝卜细胞，可以诱导植保素 6-methoxymellem 的合成。

4. 离子通道调节的传导

（1）关于模式的界定：离子通道防卫模式（（ICDM）是 Cabriel 等（1988）提出的，本书其他作者对它的概念已作过介绍（李怀方）。据 Gabriel 等自己的评述，这个模型可以克服

激发子-受体(E-R)和二聚体(Dim)模型的弱点[29]，一般也被公认更加合理。该模型承认E-R模式包括外源和内源激发子在内的E-R识别，但强调*avr*基因产物的识别能力；与E-R模型一样，假定R基因编码膜蛋白质受体。ICDM还承认Dim所强调的决定基本亲和性的专化性毒性因子的作用；期望*avr*基因的一级产物直接与R基因产物联结成二聚体。与E-R模型不同，ICDM认为异缘非亲和性(heterologous incompatibility，即微生物的种或某致病变种或式样种的所有成员在某种植物的所有成员上都不能寄生繁衍和定殖)是由于微生物毒性因子的缺失，而不是植物主动防卫的结果。至于同缘非亲和性(homlogous incompatibility，即试验观察到的一种病原物的某些成员在一种植物的某些成员上不能寄生繁衍和定殖的现象)，ICDM认为是由于R基因(蛋白质)与*avr*基因产物(蛋白质、肽或小分子化合物)的联结使离子通道开放的结果，通道一旦打开，结果或者是寄主细胞死亡，或者是主动防卫机制的被激发。ICDM假设植物细胞膜上"装备"了大量的转膜蛋白受体，与激发子联结后负责打开离子通道。受体蛋白质分3类：一是在植物中高度保守的蛋白质，对植物来源的内源激发子作出反应，可以最终开启防卫反应。二是保守性较低的蛋白质，可以对真菌中保守性激发子作出反应，这种激发子如葡聚糖和几丁质，可能是由植物酶的活动释放的。这种识别只引发低水平的反应，主要影响是强化第一类受体蛋白质与内源激发子的作用。第三类受体缺乏保守性，是通过复制和重组非正常产生的，作出的反应具有很大的条件依赖性。在真菌毒素作为激发子的情况下，这种受体分子与毒素的结合可能引起寄主细胞快速死亡，这本身对活体营养的病原物造成一种"饥饿"机制，同时还有快速诱发防卫反应的潜力。本文的结论部分将指出，这个模型同样存在种种不足。

(2) 调节信号传导的证据：激发子激起的信号通过离子通道的传导都是与Ca^{2+}密切关联的，有许多实验体系就此作了不少研究，以下就不同防卫因子举些例子。

细胞间的Ca^{2+}浓度升高可以对细胞反应产生很多影响，在动物中Ca^{2+}是信号传导系统运行的一个主要的第二信使。在植物中通过位于原生质膜和液泡膜上的Ca^{2+}-ATP酶泵的作用，Ca^{2+}的浓度一般保持在100n mol/L。大麦对霜霉病的抗性表现出与细胞间的Ca^{2+}的浓度有很大的相关性[35]。大麦细胞中Ca^{2+}的流入对由脱乙酰壳多糖激发子处理所诱发的肼胝质的沉淀也是很必要的[36]。La^{3+}可以竞争性地抑制Ca^{2+}通过原生质膜离子通道的移动，金属离子螯合剂EGTA能够抑制马铃薯中花生四烯酸(AA)诱导的植保素的合成，同时，外源的Ca^{2+}浓度的升高可以引起植保素的积累[37]。其他研究也指出，细胞内Ca^{2+}的波动参与了诱导进程，如Kurosaki等[38]用一种原生质膜上的Ca^{2+}通道的抑制剂verapamil，处理细胞可以抑制激发子以6-methoxymellein合成的诱导作用。相反，用Ca^{2+}离子载体A_{23187}进行处理，可促进外源Ca^{2+}进入细胞而刺激植保素的积累。Stab和Ebel[40]证实，当Ca^{2+}的抑制物进入细胞后，*Phytophthora megasperma*对大豆细胞glyceollin合成以及PAL活性的诱导能力受到抑制。以上这些结果所描述的是在激发子诱导植保素合成过程中Ca^{2+}所发挥的正效应。也有例外，如Kendra和Hardwiger[40]证实用脱乙酰壳多糖激发子或*Fusrium solani*处理菜豆组织能够诱导豌豆素的合成，而这个诱导过程完全不受Ca^{2+}的影响。

对马铃薯-*P. infestans*互作体系进行的对多种离子的比较研究，表明了Ca^{2+}在离子通道中的作用。它通过AA或赖氨酸聚肽的激发增强HR过程中的褐变和倍半萜烯的积

累;Si^{2+}比Ca^{2+}具有更大的影响;Mg^{2+}显示轻微的抑制作用;Na^+则没有影响[41]。当外界Ca^{2+}的水平用EGTA处理而降低时,AA诱导的倍半萜烯的积累也随之降低到原来的50%,这种抑制作用可以通过加入$CaCl_2$而被抵消。用$LaCl_3$进行处理则可以阻碍HR,$LaCl_3$被认为能够保持在原生质膜的外部,从而阻塞了Ca^{2+}离子通道。如果增加AA处理的时间,再加入$LaCl_3$,其影响就变小。当$CaCl_2$与$LaCl_3$先后加入时,$CaCl_2$抵消$LaCl_3$的抑制作用的能力取决于$CaCl_2$提前加入的时间,提前12小时则能很明显地抵消$LaCl_3$的负作用。这些结果支持了这样一种假设:Ca^{2+}是在HR的初期进入细胞的,它的进入是一个完整的信号传导过程的一部分。但Ca^{2+}的进入首先依赖于它的载体(A_{23187})的活性,这种载体是被AA激活的。

在苜蓿的细胞培养液中Ca^{2+}也能够诱导PAL活性升高和植保素积累[42]。在最适Ca^{2+}浓度下(3—4m mol/L)可以观察到PAL活性增加了7—10倍。对Ca^{2+}诱导的反应具有拮抗作用的化合物对真菌激发子诱导的PAL活性和植保素积累也具有拮抗作用,这个事实说明Ca^{2+}对于真菌激发子诱导的PAL合成具有调节作用。因此,通过洗脱消除Ca^{2+}或用EGTA处理,或者用verapamil处理细胞、或者用La^{3+}处理以阻止Ca^{2+}或真菌激发子的诱导作用,那么在经过处理的细胞中就不会观察到PAL活性的升高以及植保素的积累。与之相反,如果细胞内Ca^{2+}得到提高,那么就会增加苜蓿细胞与外源Ca^{2+}及真菌激发子反应的能力。

异源激发子诱发的植物防卫反应与Ca^{2+}通道的关系,可以用大豆病原菌*Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*激发子在欧芹上的作用来说明。欧芹是*P. megasperma* f. sp. *glycinea*的非寄主,在叶片受*P. megasperma* f. sp. *glycinea*侵染后,细胞和原生质体发生的反应与用*P. megasperma* f. sp. *glycinea*激发子刺激的反应相似。该激发子的活性成分是一种42kDa的胞外糖蛋白,它可以专一性地与欧芹原生质膜上的靶位点(target site)相连。因此,最初的跨膜信号传导导致了一个短暂的植物防卫基因的活化。信号传导链与原生质膜对Ca^{2+}、H^+、Cl^-、K^+离子的渗透性的变化密切相关;Ca^{2+}也许是由环六醇1,4,5-三磷酸盐的内部贮存释放出来的。尽管cAMP以及异源GTP联结蛋白三聚体存在于欧芹细胞中,但是没有证据表明它们参与了激发子的信号传导过程。实验中的许多反应都需要欧芹原生质体的渗透作用,而电穿孔可以替代这种渗透变化的功能,电穿孔的操作控制在允许低分子量的化合物进入胞液但并不改变激发子反应活性的程度[43]。

下一个例子是胼胝质诱导中由Ca^{2+}参与的信号传导。β-呋喃甲基-β-葡糖苷(FG)已被证明是高等植物胼胝质复合体形成的专一性内源激活剂[44]。因为FG一类的糖苷通常被隔离在液胞中,Chana等[44]用欧芹细胞进行的研究证明,胼胝质复合体的诱发形成是FG和Ca^{2+}的重新分布的结果;诱导胼胝质复合体的因子也能相应地提高细胞质中的FG浓度,这些因子包括细胞质溶液pH值的降低或Ca^{2+}浓度的升高等。低聚半乳糖醛激发子可以引起类似的变化[44],包括对与细胞质中FG偶联的胼胝质复合体的诱导。这些结果表明,细胞质和液泡之间FG的重新分布可能是胼胝质复合体激发过程中信号传导途径的一个重要组成部分。

最后要举的例子在植物种类和反应上都有代表性:在木本植物上诱发的活性氧。用云杉病原菌*Heterobasidion annosum*的细胞壁的组成成分作激发子,能够诱导云杉细胞中的活性氧的瞬间释放。这是通过诱导超氧化物歧化酶(SOD)实现的。激发子对活性氧的

诱导依赖于 Ca^{2+} 的存在，在去除 Ca^{2+} 的介质中，激发子的诱导效果明显减弱。同时，在有 Ca^{2+} 的介质中，离子载体 A_{23187} 也可以诱导活性氧的形成，在消除了 Ca^{2+} 的介质中同样不能诱导。此外，蛋白激酶抑制子星孢素(staurosporine)能够抑制氧化裂解作用。这一组结果的结论是：云杉细胞活性氧的释放可以由真菌激发子所引发，但这种激发子活性必须依靠额外的 Ca^{2+} 和蛋白激酶的活性。

六、信号传导的接收终端——基因靶序

上文介绍的激发子-受体分子、二聚体、离子通道防卫 3 个模式是从基因对基因关系解释植物抗病机制的基本模型，而激发子作用的三因子和四因子关系则属于激发子-受体分子模型的不同表现形式。除了强调的重点不同、试图包容的范围依次扩大外，3 个模型都建立在 R 基因对 *avr* 基因互作或产物识别的基础上。除个别例子中激发子看上去可以直接与基因互作[8]外，都要经过特定信号传导作用于基因的激活。实际上，目前人们真正了解的只是抗病防卫反应信号传导链的两端，即某种激发子可以诱导哪些基因激活，而对激发子与次级信使是如何联结(连接)的，信号传导是否包括多个次级信使的接力，哪种信号是与基因发生直接关系的信使等等，还完全缺乏了解。

信号传导的终端是基因靶序(TS)。这个 TS 是针对特定防卫反应功能因子的，也就是说，一个激发子并非诱导植物所有功能因子基因的表达；这取决于功能因子基因的分子组织和功能分化。概括起来说有两个主要层面。①每种功能因子(如 PRP、HRGP、植保素等)都有一套特定的编码基因；这套基因在同一类功能因子中又分成不同的基因家族(如 PRP 编码基因有 PR-1 到 PR-5 等 5 个基因家族)，每个基因家族由若干个基因成员组成，每个基因成员负责对一种或一种以上的刺激作出反应，其中包括接受激发子的刺激，接受刺激的结果是基因启动转录，每个基因成员的转录本(一个或多个)都可以编码这类功能因子的具独立功能的一种(或一种以上)产物(isotypes)，如 PRP 的酸性和碱性异构体。②每个基因成员的核苷酸序列有特定的分子组织形式和功能分区，负责接受信号的是 TS，它通常含有一个必备的反应元件(responsive element)，增强子序列也是某些基因常含的成分；多数还有内含子顺序，有的内含子对基因接受或不接受某种信号刺激显示调节作用。这大致就是激发子-信号传导链与 TS 连接的总的景象，在本书有关篇目(秦引萍等：植保素的诱导发生；王少华等：PRP；梁元存等：HRGP)将给予详细讨论。

Gabriel 等自己为他们提出的离子通道防卫模式在不同类型的抗病性(不同类型的植物-微生物互作)中是如何运转的，根据模型设计的 3 类受体分子(R 基因产物)给予了详细的的论证和例子[29]；De Wit 等[17]也是从 R-*avr* 互作或产物识别出发，界定和列举了激发子-受体识别中的基因对基因控制的互作体系，尤其是番茄-*Cladosporium fulvum* 体系中 *avr* 的作用；这些概念在另外许多文章中得到了详尽的阐述。没有解决的、与激发子紧密相关的一个问题是：哪些基因负责控制 Gabriel 等设计的 3 类受体分子？"保守性"(conserved)指的是某一防卫功能因子整套基因的特性还是它的某个基因家族或基因成员的特性？

参 考 文 献

[1] 董汉松，寄主植物与病原微生物间的相互识别。见：农业生物技术进展与展望——国家863计划生物技术领域第一主题学术研讨会论文选编92′(贾士荣主编)。合肥：中国科学技术大学出版社，1993，65－79。

[2] Oku, H. Gene expression in susceptibility and resistance of fungal plant diseases. In: Molecular Signals in Plant-microbe Communications (Verma, D. P. S. ed). London: Boca Raton, Ann Arbor: CRC Press, 1991, pp. 49－64.

[3] Wei, Z. M., Iaby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W, He, S. Y., Collmer, A., Beer, S. V. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science, 1992, **257**: 85－88.

[4] Beissmann, B., Engels, W., Kogel, K., Marticke, K. H., Reisemer, H. J. Elicitor-active glycoproteins in apoplastic fluids of stem-rust-infected wheat leaves. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1992, **40**: 79－89.

[5] Zanetti, A., Beauvas, F., Huet, J. C., Pernollet, J. C. Movement of elicitins, necrossis-inducing proteins secreted by *Phytophthora* sp. in tobacco. Planta, 1992, **187**: 163－170.

[6] Zook, M. N., Chappell, J., Kuc, J. A. Characterization of elicitor-induction of sesquiterpene cyclase activity in potato tuber tissue. Phytochem. 1992, **31**: 3441－3445.

[7] Frey, T., Cosio, E. G., Ebel, J. Affinity purification and characterization of a binding protein for a β-glucoside phytoalexin elicitor in soybean. Phytochem. 1993, **32**: 543－550.

[8] Smith, C. J. Signal transduction involved in elicitation of phytoalexin synthesis in *Medicago sativa* L. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions (Smith, C. J. ed.). Oxford: Oxford Science Publications. 1991, 255－270.

[9] Estrella, R., Blumwald, E., Higgins, V. J. Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells: evidence for the involvement of active oxygen species. Plant Physiol. 1992, **99**: 1208－1215.

[10] Ren, Y. Y., West, C. A. Elicitation of dipertene biosynthsis in rice by chitin. Plant Physiol. 1992, **99**: 1169－1178.

[11] 董汉松，植物识别子与病原物识别子间的互作。植物生理学通讯，1991，**27**：391－396。

[12] Choi, D., Ward, B. L., Bostock, R. M. Differential induction and suppression of potato 3－hydroxy－3－methylglutaryl coenzyme: A reductase genes in response to *Phytophthora infestnas* and to its elicitor arachidonic acid. Plant Cell, 1992, **4**: 1333－1344.

[13] Nakagawara, S., Nakamura, N., Gguo, Z., Sumitani, K., Katoh, K., Ohta, Y. Enhanced formation of a constitutive sesquiterpenoid in cultured cells of a liverwort, *Calypogeia granulata* during elicitation, effects of vanadate. Plant Cell Physiol. 1993, **34**: 421－429.

[14] Eyai, Y., Sagee, O., Fluhr, R. Dark-induced accumulation of a basic pathogenesis-related (PR-1) transcript and a light requirement for its induction by ethylene. Plant Mol. Biol. Int. 1992, **19**: 589－599.

[15] Bol, J. F., Linthorst, J. M., Cornelissen, B. J. Plant pahtogeneses-related proteins induced by virus infection. Annu. Rev. Phytopathol. 1990, **28**: 113－138.

[16] Nagewara, R. M., Kuc, J. Induced systemic resistance in plants. In: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals (Cole, G. T. ed.). New York: Plenm Press, 1991, 347－357.

[17] De Wit, P. J. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 1992, **30**: 391－418.

[18] Albershem, P., Anderson, A. J. Carbohydrates, proteins, cell-surfaces, and the biochemistry of pathogenesis. Annu. Rev. Plant Physiol. 1975, **26**: 31－52.

[19] Yoshikawa, M., Keen, N. T., Ming-Chang, W. A receptor on membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation. Plant Physiol. 1983, **73**: 497－506.

[20] Cosio, E. G., Popper, H., Schmidt, W. D., Ebel, J. High－affinity binding of fungal β－glucan fragments to soyabean microsomal fractions and protoplasts. Eur. J. Biochem. 1988, **175**: 309－315.

[21] Hadwiger, L. A., Beckman, J. M., Adams, M. J. Localization of fungal components in the pea-*Fusarium* interaction detected immunochemically with antichitosan and antifungal cell wall antisera. Plant Physiol. 1981, **67**: 170－175.

[22] Nock, E. P., Smith, C. J. Identification of polysaccharide hydrolases involved in autolytic degradation of *Zea* cell walls. Plant Physiol. 1987, **84**: 1044—1050.

[23] Yoshikawa, M., Yamaoka, N., Takeuchi, Y. Elicitors: Their significance and primary models of action in the induction of plant defense reactions. Plant Cell Physiol. 1993, **34**: 1163—1173.

[24] Doke, N., Garas, N. A., Kuc, J. Effect of host hypersensitivity suppressors released during the germinatioin of *phytophthora infestans* cystospores. Phytopathol. 1980, **70**: 35-43.

[25] Kuc, J., Henfling, J., Garas, N., Doke, N. Control of terpenoid metabolism in potato-*Phytophthora infestans* interaction. J. Food Prot. 1979, **42**: 508—519.

[26] Storta, E., Pelucchini, D., Tegli, A., Scala, A. A potential defense mechanismm of tomato against the late blight disease is suppressed by germinating sporangia-derived substances from *phytophthora infestans* J. Phytopathol. 1988, **121**: 275—282.

[27] Basse, C. W., Boller, T. Glycopeptide elicitors of stress responses in tomato cells: N-linded glycans are essential for activity but act as suppressors of the same activity when released form the glycopepetides. Plant Physiol. 1992, **98**: 1239—1247.

[28] Davis, D. A., Tsao, D., Seo, J. H., Emery, A., Low, P. S., Heinstein, P. Enhancement of phytoalexin accumulation in cultured plant cells by oxalate. Phytochem. 1992, **31**: 1603—1607.

[29] Gabriel, W. G., Rolfe, B. G. Working moldels of specific recognition in plant-microbe intractions. Annu. Rev. Phytopathol. 1990, **28**: 365—381.

[30] Jocelyn, M., John, P. C., Daniel, F. K., Ilya, R. Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infectioin. Science, 1991, **250**: 1001—1006.

[31] Nasser, Y., Paul, S., Wilson, T. M., Daniel, A. K., Llya, R. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenses-related proteins in virus-infected tobacco. The Plant Cell, 1991, **3**: 809—818.

[32] Chen, Z. X., Daniel, F. K. Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease-resistance response. Proc. Natl. Acad. Sci. 1991, **88**: 8179—8183.

[33] Legendre, L., Heinstein, P. F., Low, P. S. Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitatioin of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. J. Biol. Chem. 1992, **267**: 20140—20147.

[34] Cooke, C. J., Newton, R. P., Walton, C. G. Pathogenic elicitation of phytoalexin in lucerne tissue: Involvement of cyclic AMP in the intracellular mechanism. Biochemical Society Transactions. 1989, **17**: 919—920.

[35] Bayles, C. G., Aist, J. R. Apparent calcium mediation of resistance of an *ml-o* barley mutant to powdery mildew. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1987, **30**: 337—345.

[36] Waldman, T., Jeblisk, W., Kauss, H. Induced net Ca^{2+} uptake and callose biosynthesis in suspension-cultured plant cells. Planta. 1991, **173**: 88—95.

[37] Zood, M., Rush, J., Kuc, J. A role for Ca^{2+} in the elicitation of rishtin and lubimin accumulatiion in potato tuber tissue. Planta Physiol. 1987, **84**: 520—525.

[38] Kurisaki, F., Tsurusawa, Y., Nishi, A. The elicitatioin of phytoalexins by Ca^{2+} and cyclic AMP in carrot cells. Phytochemistry, 1987, **26**: 191—1923.

[39] Stab, M. R., Ebel, J. Effects of Ca^{2+} on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells. Arch. Biochem. Biophy. 1987, **257**: 416—423.

[40] Kendia, D. F., Hadwiger, L. A. Calcium and calmodulin may not regulate the disease resistance and pisatin formation responses of *Pisum sativumto* chitosan or *Fusarum solani*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1987, **31**: 337—348.

[41] Carol, L. P., Kuc, J. A. Phytoalexin, elicitors, enhancers, suppressors ad other considerations in the regulation of R-gene resistance to *Phytophthora infestans* in potato. In: Molecular Determinants of Plant Diseases (Nishimura, S., Vance, P. C., Doke, N. eds.). Tokyo: Japan Sci. Soc. Press, Berlin: Springer-Verlag, 1987, 203—221.

[42] Smith, C. J., Newton, R. P., Mullins, C. J., Waltan, T. J. Plant host-pathogen interaction: elicitation of phenylalanine ammonia lyase activity and its mediation by Ca^{2+}. Biochem. Soc. Transac. 1989, **16**: 1069—1070.

[43] Renelt, A., Colling, C., Hahibrock, K., Nurnberger, T., Parker, J. E., Sacks, W. R., Scheel, D. Studies on elicitor

recognition and signal transduction in plant defence. J. Exp. Bot. 1993,**44**:257—268.
[44] Ohana,P. ,Benziman,M. ,Delmer,D. P. Stimulation of callose synthesis *in vivo* correlates with changes in intracellular distribution of the callose synthase activator β-furfryl-β-glucoside. Plant Physiol. 1993,**101**:187—191.

THE ELICITORS:THEIR FUNCTION,WORKING MODEL AND PROCESS,AND MOLECULAR GENETICS IN PLANT DEFENCE AGAINST DISEASES

Dong Hansong,Pan Jun and Liu Aixin

Elicitors are primarily defined as small and diffusible compounds produced by pathogenic fungi and responsible for inducing synthesis of phytoalexins. While at the present,they have been expanded to include any biotic molecule with roles of inducing any functional defence element involved in induced resistance of plants to diseases. They can be generated by plant hosts, pathogenic and nonpathogenic microbes, and plant-pathogen interaciton processing. They are chemically of oligo-saccharide, glycoprotein and peptide. For all of them,there is a distinction of exogenous(or primary)and endogenous(secondary)elicitors. Sometimes,abiotic factors which can elicit special responses of plant disease defence are also included and called abiotic elicitors.

Elicitors take their roles in induced resistance and incompatible resistance following a basic model elicitor-receptor recognition,which has two modified models,i. e. elicitor/suppressor-receptor (three-factor) and suppressor-enhancer/elicitor-receptor (four-factor)interactions. In the three-factor model,the suppressor acts either by competing the receptor with the elicitor or by metabolic inhibition to the elicitor. In the four-factor model,complicated relations exist among the four factors. First of all,enhancer may be a mediator between elicitor and receptor,and aid elicitor to bind with the receptor,in the plant-pathogen interaction without suppressor. Secondly,in interactions with suppressors,enhancers would bind in advance to receptors to protect them from being bound by suppressors and then remove alone when elicitors reach to the receptor. Similar deduction can be made when suppressors act by metabolic inhibition in which related enzymes are usually involved. Apart from these three models,there are two models with more extensive implication,i. e. the dimer and ion channel defence models. In these two models, elicitors are hypothesized to be products of avirulence genes of pathogens,and the recognition between the elicitors and receptors is only one of the mechanisms that trigger or contribute to plant defence against pathogens,along with other mechanisms such as disturbance by plants to basic compatibility of pathogens besides the critical hypothesis of the ion channel defense model that incompatible resistance is the result of the opening of

the ion channel.

Regardless of being the primary or secondary products of avirulence genes, the elicitors are only the primary end of responsive chain and network of plant disease defence. Signal transmission is putatively required and secondary messenger involved. An exception is the elicitin produced by all other species of *Phytophthora* apart from *P. nicotianae* infecting tobacco. The elicitin shows ability of *in vivo* transduction without need of mediator factor. In most cases, the elicitor only give plants a primary stimulus, and this primary signal needs to be transducted by certain mediators to aid. Three mediation ways are involved. The first one is by specific secondary—receptor protein for the sceondary messenger, such as the salicylic acid binding protein in tobacco in which salicylic acid is evidenced to be a secondary messenger of the plant defence elicited by virus (TMV) infection and characterized by hypersensitive response. The second and third ways are respectively by cyclic AMP and ion channel. No matter what mediation ways are followed, the final aim of the signal transmission will be the target sequences of related genes. These genes are differently responsible for encoding certain functional defence factors and have differentiated to possess one or more responsive elements which can response specially to, or specially receive, one or more specific signals originally relayed from the exogenoous (primary) elicitors. After the target sequence (TS) has received the signal, transcription activation of the gene is followed. Thus, a general schedule is as follows: primary (exogenous) elicitor→sceondary (endogenous) elicitor, or secondary messenger→secondary messenger (?)→TS→transcription activation→functional elements.

There are still series of problems remained to be resolved in the start and process of the signal transmission. The most important series of problems are that which one is the critical factor to trigger the defence among different elicitors which include race-specific and nospecific, and prodeinaceous and glycoproteinaceous properties often in a same plant-pathogen interaction system, and that what are the accurate processes and mechanisms existing in the sequence from elicitor, *via* signal transmission, to the TS, besides the unreasonableness in the models, even in the ion channel defence model, being thought to be most reasonable so far at least in Chinese articles. For example, the ion channel defence model designed three kinds of receptors, i. e. highly conserved, less highly conserved, and poorly conserved transmembrane protein receptors. Then, which R gene is responsible for encoding each of the three conserved level proteins? Is the "conserved" property present in R genes or both R and *ds* (defence responsive) genes? If being the former, how do the more than two genes controlling plant-pathogen interactions perform "conservedly"? If being the later, are a special member of or all of members of a ds gene family "conserved"?

植物保卫素的诱导

秦引萍　彭友良

一、引　　言

通过仔细研究马铃薯对晚疫病菌的抗感反应后，Muller 和 Borger 于 1940 年提出了植物保卫素(phytoalexin，以下简称植保素)的概念，phytoalexin 源于希腊文，意指"warding off agents in plants"[1]。一直到 1958 年 Muller 研究发现菜豆荚穴中的侵染液滴(infection droplets)中含有抑制病菌(*Monilinia fructicola*)孢子发芽的化学物质[2]，植保素的研究才有了一次突破。1960 年，Cruickshank 和 Perrin 从豌豆荚穴侵染液滴首次分离、结晶出植保素 pisatin[3]，1963 年又以菜豆荚穴侵染液滴实验再次纯化出植保素 phaseollin[4]。从此之后，有关植保素及其在抗病性中作用的研究引起了人们极大的关注和兴趣，越来越多的研究者涉入这个领域，对植保素进行了广泛而深入的研究。

60 年代到 80 年代初的这一时期，有关植保素的种类、产生的寄主范围和激发子类型等方面的研究均取得了很大的进展。在同一时期，有关植保素的其他几个重要问题，如植保素与抗病性的关系，合成途径和场所，在细胞中的分布、积累、代谢情况，也有了较为深入的探讨。Bailey(1982)曾用图示总结了植保素合成途径的研究结果[5]；Moesta 等(1982)和 Hahn 等(1985)通过生物化学或生物物理方法追踪、检测植保素及其合成途径相关酶积累的时间、水平和部位，以此解析它们与植物抗感反应间的关系[6,7]。

近年来，随着分子生物学技术的发展和植物转化再生技术的成熟，人们也希望通过基因工程手段人工操纵植保素合成酶基因的表达以增强植物的抗病性，于是植保素诱导合成分子机制方面的研究愈来愈受到注目。据 Cramer 和 Radin(1990)统计，已有 8 种与植保素合成相关的酶的基因得到克隆，但主要源于豆科、茄科和蓖麻等双子叶植物[8]。近两年来，有关水稻等主要禾本科农作物的植保素合成酶及其基因的研究也已开始[9,10]。尤其是，1993 年 Hain 等成功地把外源植保素合成酶基因导入烟草，获得了抗病的转基因烟草[11]，由此通过操纵植保素合成酶基因培育工程抗病品种的这一设想已变为现实。

本文将综述有关植保素的诱导合成和积累的特点、机制、及其在植物抗病中的作用等研究结果，并把我们实验室新近一些研究结果及工作设想作为进行植保素合成途径、基因操作与持久抗病基因工程的一个研究例子介绍给大家。

二、植保素的诱导

1. 植保素的种类

据 Ebel[12]统计，至少有 150 种植保素得到了分离和纯化，从化学结构上大致分为简单酚类(simple phenolics)、类黄酮类(flavonoids)、异类黄酮(isoflavonoids)、芪类(stil-

benes)、萜类(terpenes)、聚乙炔(polyacetylenes)等六类。它们主要分布于21科的植物中,其中包括一些重要的农作物所在的禾本科、豆科和茄科。而且同一科植物的植保素具有结构保守的特点,如豆科植物的植保素主要属于异类黄酮类[13],茄科植物的植保素主要属于sesquiterpenoids,但stilbenes的分布却颇为广泛,能在亲缘关系较远的植物中诱导产生。

2. 各类病原物侵染诱导的植保素产生

根据报道的结果,真菌、细菌、病毒和线虫等对植物的侵染都能引起植保素的合成和累积,其中有关真菌侵染诱导的植保素研究最为广泛深入。真菌诱导的植保素的种类一般是由受侵染植物所决定的,亦即:同一种植物受不同病原真菌的侵染诱导产生的植保素种类是相似的。但是也有一些研究表明:不同病原真菌侵染同一种植物可诱导产生不同的植保素。例如*Rhizoctonia solani*侵染French bean主要诱导产生kievitone类植保素,但这类植保素在*Fusarium solani*或*Thielaviopsis basicola*侵染的French bean组织中没有检测到[14]。真菌诱导植保素合成、累积到一定量后,常维持一段时间不变,但是也有些例外,如kievitone类植保素在*R. solani*侵染French bean形成的初期病斑中迅速累积;几天后,该植保系很快降到很低水平,此间,另一类植保素phaseollin的浓度却增加。同一真菌侵染不同植物常诱导产生不同植保素。绝对寄生菌如白粉菌、锈菌也能诱导植保素的产生,但一般局限于那些形成组织坏死的作物品种中。有关细菌诱导产生植保素的报道多见于*Pseudomonas*和*Erwinia*的一些种侵染引起的病害中,也较为复杂。例如:大豆真叶在接种*P. pisi*后产生glyceollin的3种异构体,当用*E. carotovora*接种大豆的子叶时,虽然也产生上述的3种异构体,但主要累积的植保素却是glycinol,这种植保素在大豆真叶中不被诱导积累[15,16]。病毒诱导产生植保素多见于烟草坏死病毒(TNV)侵染引起植物形成的局部病斑中。已有几种线虫也被报道可以侵染诱导植物产生植保素,在这些情况下,植保素常累积于带有色素的坏死组织中。

三、诱导机制

植保素是植物抵抗外来生物或非生物因子侵袭而产生的低分子抗菌性物质。其诱导因素包括生物因子(真菌、细菌、病毒、线虫及其他有机体)和非生物因子(紫外照射、损伤、部分冰冻、重金属盐、化学试剂、农药或生物代谢产物)。在受到生物因素侵袭时,会由植物本身、或入侵病菌、或它们双方的代谢作用而产生一种诱导物质,它们可以刺激植物开始植保素的合成与积累,故称之为植保素的激发子(elicitor);根据其来源分为生物型(biotic)和非生物型(abiotic)激发子。

第一个广泛研究的植保素生物型激发子,monilicolin A,来源于*Monilinia fruction*即一种果树病原菌中[17],它是一个小肽,能够诱导菜豆(*Phaseolus vulgaris* cv. red kidney)豆荚内植保素的积累,却在其寄主或其他的非寄主植物上不能诱导植保素的积累。现就激发子的类型、特征及其诱导植保素产生的机制做一些介绍。

1. 源于病菌或植物胞壁的生物型激发子

Phytophthora megasperma f. sp. *glycinea*的胞壁物质寡聚糖,是一种最有代表性的

源于病菌的激发子。它们是 *P. megasperma* 胞壁的部分酸解产物，经分离纯化到的最小激发子 hepta-β-glucoside-alditol 具有如下特点：其工作浓度为 $10^{-3}-10^{-4}\mu$ mol/L，每片大豆子叶只要有 0.6ng 激发子，便可诱导植保素 pterocarpan 达到最高诱导产量的 50%水平；结构主骨架为连接的葡萄糖残基，两个支链间只隔一个葡萄糖残基，其一末端残基与一支链相邻[18]。而且有研究指出：从大豆组织中纯化的 β-1，3-endoglucanase 可以使 *P. megasperma* 细胞壁游离出这类激发子[19]。除此之外，来自 *Cladosporium fulvum* 的糖蛋白被鉴定为是番茄植保素 rishitin 的激发子[20,21]。Eicosapentaenoic 和 arachidonic acids 从 *Phythophthora infestans* 菌丝中分离出来，也被鉴定为是诱导马铃薯组织合成、累积植保素的激发子[22]。Endo-β-1，4-polygalacturoanase 已从 caster bean (*Ricinus communis*)组织培养滤液中分离纯化出来，可分解植物胞壁物质并释放出具有激发子活性的寡聚糖。Lee 等[23]研究发现，该物质不仅能诱导植保素 casbene 的合成，而且提高了 caster bean 中 casbene 合成酶的活性，两过程在时间上体现着高度一致性。

2. 非生物型激发子

植保素的非生物激发子包括重金属盐、化学试剂、农药和去污剂等[24-26]，所有这些具有激发子活性的物质都与植物细胞的损伤和死亡相联系[27]，而且许多研究还证明，冰冻、受热或 UV 处理造成植物细胞的死亡，同样可以诱导植保素的合成积累[28,29]。在上述一些情况下，Dixon 等(1983)认为：植保素产生是由低分子量、可扩散、热稳定的激发子诱导形成的结果[30]。因此出现一种假设：植物的健全细胞含有一种分子，它们在细胞受到伤害或死亡时能够释放出来，刺激植保素在周围的健康细胞中合成积累[31]。已有一些研究结果支持这种假设，如植物受到上述的非生物因子刺激后会使一些酶激活，它们能够帮助翻译植物的细胞壁激发子[29]。

另外，有些化学农药虽然不具或具有很弱的体外抑菌、杀菌作用，但能促进植物在受到病菌刺激后诱导植保素的产生。Cartwright 等[32]首次报道了这个发现。他们用防治水稻稻瘟病的一种内吸性杀菌剂 2，2-dichloro-3，3-dimethyl cyclopropano carboxylic acid (WL28325)处理水稻根后接种稻瘟菌时发现：水稻植保素 monilactoneA 和 B 比接种非药剂处理的对照高出很多，而且在接种后 96 小时仍没有下降的趋势。另一种防治稻瘟病的化学农药 probenazole 在体外的抑菌作用相当弱，但施用到田间水稻上对稻瘟病有很好的防效。Sekizawa 等(1981)的研究结果表明：probenazole 能促进感染植物体内诱导合成、累积亚麻酸和亚油酸及其氧化衍生物；亚麻酸和亚油酸的氧化衍生物在体外对稻瘟菌孢子萌发、菌丝生长具有很强的抑制作用[33,34]。

四、植保素在植物抗病中的作用

植保素的的诱导产生和体外抑菌活性暗示它们的合成和累积可能参与植物抗病作用。但是要证明植保素在植物抗病中起着重要作用，还必须弄清：①其诱导是否具抗性品种或抗性组合特异性；②诱导产生的时间是否与体内病原物生长受抑相一致；③体内累积水平是否达到体外抑菌活性浓度；④植保素在体内是否与病原物直接接触等几个问题。下面介绍有关这些方面课题的代表性研究。

1. 植保素诱导的时空动态和特异性

有关植保素产生累积的特异性和时空动态的报道很多。Keen(1972)用 *Phytophthora megasperma* 非亲和小种接种大豆 24—28 小时后，植保素 glyceollin 和 glycinol 在受侵染组织的积累量可以由原来的检测不出变为占干物质的 10%以上[35]。在一个非亲和性互作组合中，植保素的积累始于接种后 6—7 小时；8 小时达到 EC90(0.6m mol/L)；9—12 小时病菌菌丝生长开始受抑甚至停止。而在亲和性组合中，受侵组织层中的 glyceollin 在接种后任何时间也不会超过 EC90[36]。

Pierce 和 Essenberg[37]在研究棉花子叶受 *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* 侵染后发现：侵染点周围的褪绿叶肉细胞产生自体荧光，而植保素 lacinilene C(LC)正是特异地拥有该种荧光特性；抗性组合比感性组合的受侵叶肉细胞多含 10—25 倍的 LC 及 40 倍的 LC 前体物质 DHC(2,7-dihydroxy cadalene)。

Peng 等(1994)在进行稻瘟菌侵染的稻叶的生化分析时发现了一种脂类植保素。该植保素仅积累于非亲和性稻瘟菌侵染的稻叶中，感病组合和健全叶经 HPL(high performance liquid chromatography)比较分析均未检测出。而且该植保素在非亲和性菌侵染稻叶中积累开始时间与细胞学、组织学观察到的侵染菌丝的受抑和死亡相一致[38]。

利用植保素 glyceollin I 的放射免疫特异性与病菌菌丝的免疫金染色，Hahn 等(1985)细致检测了 *P. megasperma* 侵染的大豆根中 glyceollin I 的积累和 *P. megasperma* 的菌丝生长情况，他们发现：glyceollin 的积累时间及空间分布与根组织中病菌菌丝的生长受抑(非亲和性组合)完全吻合。非亲和性组合中，glyceollin 积累浓度在病菌菌丝生长点的邻近组织中超过 EC50；而在亲和性互作组合中，glycelollin 不仅浓度低而且主要存在于菌丝生长点后面的植物组织中[7]。

2. 植保素在抗病作用中重要性的部分证据

通过施用酶抑制剂阻止植保素合成，也是一种证明植保素抗病作用的有力手段。Moesta 和 Grisebach 通过在大豆上施用 PAL(phenylalanine ammonia lyase)的抑制剂(L-Z-amino-3-phenyl proprionic acid)，能使原来的抗病品种失去对 *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* 的抗性[39]。

Van Etten 等从田间收集了 200 多个 *N. haematocca* 小种，经分析研究后发现：所有强毒性小种都具有脱甲基能力，可以解除植保素 pisatin 的毒性；而所有弱毒性小种不具有脱甲基能力，对 piastin 敏感[40]。最近，同一研究小组将 *Fusarium solani* f. sp. *pisi* 的降解 pisatin 的酶基因导入到玉米小斑病菌 *Cochliobolus heterostphus* 中使转化菌获得了侵染豌豆的能力[41]。

利用分子生物学技术，把植保素合成酶基因导入目标植物中来证明植保素在抗病中的重要性的研究例子还颇为鲜见。Hain 等(1993)从葡萄(*Vitis vinifera*)上分离 stilbenes 合成酶基因，通过直接导入和根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介体基因导入法把外源的 stilbenes 合成酶基因整合到烟草的染色体上，获得了烟草抗性转基因植株。该植株用 *Botrytis cinerea* 接种后 30 分钟就有 stilbenes 合成酶 RNA 的积累，2—8 小时为其高峰，酶的活性峰稍比 RNA 合成落后；植保素 resveratrol 积累始于接种后 24 小时，峰

值出现于接种后 48 小时；而且转基因植株抗性越高，植保素的水平越高。由于 hydro-stilbenes(resveratrol)形成的前体物质 malonyl-CoA 和-coumaroyl-CoA 普遍存在于植物中，该类植保素的合成只要有 stilbenes 合成酶的存在便能实现[11]。此项研究表明：利用重组 DNA 技术，使外源植保素在其他的植物-病原物系统中诱导合成，以此获取抗性品种已不再是幻想。

尽管如此，在人工控制植保素合成，进行植物抗病基因工程时，还有如下几个急需解决的问题。①如何控制植保素的诱导性合成和积累。由于植保素除对病原微生物有害外，对高等植物和哺乳动物的细胞也具有杀伤作用[42,43]。理想的目标是植物在受侵染之后诱导性地合成和积累植保素，并且局限于侵染点附近的寄主细胞中。②如何利用基因工程手段控制植保素合成，获得抗病持久性作物品种。③克隆植保素合成途径系列酶的基因。植保素作为植物的次生代谢产物，其合成途径长、涉及的酶反应多，给克隆这些酶的基因带来了许多困难。

五、氧化脂肪酸类植保素合成途径的基因操作与持久抗稻瘟病基因工程

研究植保素的应用价值可以概括为两个方面：①为合成新的化学农药提供信息；②为抗病基因工程奠定基础。随着分子生物学和基因重组技术的不断发展，后者愈来愈受到重视。水稻稻瘟病氧化脂肪酸类植保素合成途径——脂肪酸加氧酶途径的基因操作，被认为是获取水稻持久抗稻瘟病品种的一个颇有希望的途径[44]。

1. 合成途径

氧化脂肪酸类植保素是水稻受稻瘟菌侵染之后产生的一类植保素[45,46]，彭友良及其日本合作者们[44,47,48]的研究表明：脂肪酸加氧酶途径参与此类植保素的合成。该途径主要由 3 个酶催化：第一步在脂类酰基水解酶(lipid acyl-hydrolase，LAH)催化下释放自由态的亚油酸(linoleic acid)和亚麻酸(linolenic acid)，第二步在脂肪酸加氧酶(lipoxygenase，LOX)催化下变第一步产物为 hydroperoxy 型脂肪酸，第三步在 peroxygenase(POG)催化下变第二步产物为 hydroperoxy、epoxy 和 hydroxy 型脂肪酸。1991 年他们经进一步研究确认了该途径中的 LOX 和 POG 在稻瘟菌非亲和侵染叶中受侵染诱导被激活。

2. 酶诱导的特异性和时间动态

值得提出的是该 LOX 途径的激活具有严格的小种特异性的特点。采用两个不同稻瘟菌小种——亲和性 007＃小种和非亲和性 131＃小种接种同一水稻品种爱知旭(Aichi-asahi)时，抗病组合中 LOX 和 POG 的活性明显上升，感病组合和健全植株中两酶的活性基本不变。且前者的活性上升与组织学观察到的受侵细胞中病菌菌丝的生长受抑在时间上相一致[49]。最近，通过高抗(关东 51)、抗(山彦)和中抗(石狩白毛)等 3 个抗性程度不同的品种接种叶中 LOX 和 POG 活性上升及同功酶变化的研究，我们还发现[50]：①LOX 途径的激活是水稻对非亲和性稻瘟菌的一种普遍的生化反应；②该途径中系列酶的活性上升时间随水稻的抗性增加而逐步提前。高抗品种始于接种后 18－24 小时，抗性品种于 30

—36 小时，中抗品种则为 40—48 小时。该结果与 Peng 和 Shishiyama 组织学观察到的上述 3 类品种上侵染菌丝的受抑时间相一致[51]；③在不同抗性品种中，LOX 及 POG 的诱导同工酶相同。

3. 蛋白质纯化及基因克隆

纯化氧化脂肪酸类植保素合成酶、克隆其基因是近期植物生物化学、分子生物学的研究热点之一。已有许多文章报道了脂肪酸加氧酶基因的克隆，其中有两个源于水稻[52,53]。但是，这些基因的产物对底物的特异性、诱导合成时间等不同于氧化脂肪酸类植保素合成途径中的 LOX 同工酶。有关 POG 也有几个实验室正在进行纯化工作[54,55,48]，但尚未获得纯品，其基因克隆尚需一定时间。目前，在我们实验室已从非亲和性稻瘟菌接种叶中纯化了 LOX，并进入基因克隆的准备工作；POG 已得到部分纯化；LAH 的纯化也已开始。

4. 应用设想

稻瘟病是水稻上的一种重要病害，抗病品种的培育和种植是控制稻瘟病的最根本措施。由于目前采用的优良品种大多属于小种专化性抗病品种，推广不久就会因新优势小种的出现而丧失抗性。为攻克这一难关，我们[44]认为：通过寻求感染诱导、非特异性表达的基因启动子，以此来控制氧化脂肪酸类植保素合成途径系列酶在原来是亲和性的稻瘟菌侵染植株中的表达，将有可能获得持久性抗稻瘟病的水稻品种。

六、结　语

植保素的诱导合成和积累是植物抵抗微生物侵袭的一个重要机制。由于目前尚无方法准确测定感染位点植物细胞中植保素的累积浓度及部位，植保素诱导在抗病中的作用尚未得到完全证明。但是最近许多生物化学家、分子生物学家也开始涉及植保素的研究，随着生物化学和分子生物学的不断导入，相信植保素在抗病中的作用及其机制不久将得到充分的解析和证明。这些研究从应用上将有助于开发和利用植保素，开辟新的抗病育种途径。

参 与 文 献

[1] Deveral, B. J. Introduction. In: Phytoalexins (Bailey, J. A., Mansfield, J. W. eds.). Blackie, 1982, 1—20.

[2] Muller, K. The formation and the immunological significance of phytoalexin produced by *Phaseolus vulgaris* in responses to infectiions with *Scerotinia fructicola* and *Phytophthora infestans*. Aust. J. Biol. Sci. 1985, **11**: 275—300.

[3] Cruickshank, I., Perrin, D. R. Isolation of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. Nature, 1960, **187**: 799—800.

[4] Cruickshank, I., Perrin, D. R. Phytoalexins of the Leguminosae, Phaseollin from *Phaseolus vulgaris* L. Life Sci. 1963, **2**: 680—682.

[5] Bailey, J. A. Mechanisms of phytoalexin accumulation. In: Phytolexins (Bailey, J. A., Mansfield, J. W. eds.). Blackie, 1982, 289—318.

[6] Moesta, P., West, C. A. Casbene synthetase: regulation of phytoalexin biosynthesis in *Ricinus communis* L. seedings, Purification of casbene synthetase and regulation of its biosynthesis during elicitation. Arch. Biochem. Bio-

physi. 1985,**238**:325—333.

[7] Hahn,M. G. ,Banhoff,A. ,Grisebach,H. Quantitative localization of the phytoalexin glyceollin I in relation to fungal hyphae in soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Plant Physiol. 1985,**77**: 591—601.

[8] Cramer,C. J. ,Radin,D. N. Molecular biology of plants. In: Biotechnology of Plant-Microbe Interactions (James, P. N. ,Charles,H. eds.). Mcgraw-Hill Publishing Company,1990,1—49.

[9] Lamb,C. J. ,Qun Zhu,R. ,Yamamoto,T. ,Beeche,A. ,Nelson,A. J. ,Lawton,M. A. Defense gene regulation. Rice Genetics IRRT,Manila,Philippines,1991,529—537.

[10] Hasegawa,M. ,Kodama,O. ,Akatsuka,T. Induction of naringenin of 7-O-methyltransferase in ultraviolet rice leaves. In:Abstracts of Third International Workshop on Rice Molecular Biology. 1991,621.

[11] Hain,R. ,Reif,H. J. et al. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature, 1993,**361**:153—156.

[12] Ebel. J. Phytoalexin synthesis:the biochemical analysis of the induction process. Annu. Rev. Phytopathol. 1986, **24**:235—264.

[13] Ingham,J. L. Phytoalexins from the Leguminosae. In:Phytoalexins (Bailey J. A. ,Mansfield,J. W. eds.). Blackie, 1982,21—80.

[14] Smith,D. A. Accumulation of phytoalexins in *Phyaseolus vulgaris* hypocotyls following infection by Rhizoctonia solani. Physiol. Plant Pathol. 1975,**5**:51—64

[15] Ingham,J. L. ,Keen,N. T. ,Mulherirn,L. J. ,Lyne,R. T. Inducibly-formed isoflavonoids from leaves of soybean (*Glycine* max.). Phytochemistry,1981,**20**:795—798.

[16] Weinstein,L. I. ,Hahn,M. G. ,Albersheim,P. Isolation and biological activity of glycinol,a pterocarpan phytoalexin synthesized by soybeans. Plant Physiol. 1981.

[17] Cruickshank,I. A. M. ,Perrin,D. R. The isolation and partial characteriation of monilicolin A,a polypeptide with phaseollin-inducing activity from *Monilinia fracticola*. Life Sci. 1968,**7**:449—458.

[18] McNeil,M. ,Darvil,A. G. ,Aman,P. ,Franzen,L. -E. ,Albersheim,P. Structural analysis of complex carbohydrates using high-performance liquid chromatography,gas chromatography,and mass spectrometry. Methods Enzymol. 1982,**83**:3—45.

[19] Keen,N. T. ,Yoshikawa,M. β-1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. Plant Physiol. 1983,**71**:460—465.

[20] Dewit,P. J. G. M. ,Roseboom,P. H. M. Isolation,partial characterization and specificity of glycoprotein elicitors from culture filtrates, mycelium and cell walls of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). Physiol. Plant Pathol. 1980,**16**:391—408.

[21] Dewit,P. J. G. M. ,Spikman,G. Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladopsporium fulvum* and tomato. Physiol. Plant Pathol. 1982, **21**:1—11.

[22] Bostock,R. M. ,Kuc,J. ,Laine,R. A. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in potato. Science. , 1981,**212**:67—69.

[23] Lee,S. -C. ,West,C. A. Polygalacturonase from *Rhizopus stoloni*, an elicitor of casbene synthetase activity in castor bean (*Ricinus communis* L.)seedlings. Plant Physiol. 1981,**67**:33—39.

[24] Hargreaves,J. A. Investigations into the mechanism of mercuric chloride stimulated phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*. Physiol. Plant Pathol. 1979,**15**:279—287.

[25] Hargreaves,S. A. Accumulation of phytoalexins in cotyledous of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.)following treatment with triton(T-octylphenol polyethoxyethanol)surfactants. New Phytol. 1981,**87**:733—741.

[26] Tomiyama,K. ,Fukaya,M. Accumulation of rishitin in dead potato-tuber tissue following treatment with $HgCl_2$. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 1975,**41**:418—420.

[27] Bailey,J. A. ,Rowell,P. M. ,Arnold,G. M. The temporal relationship between host cell death,phytoalexin accu-

mulation and fungal inhibition during hypersensitive reactions of *Phaseolus vulgaris* to *Colletotrichum lindemuthianum*. Plant Physiol. 1980, **17**: 32—339.

[28] Hargreaves, J. A. , Bailey, J. A. Phytoalexin production by hypocotyls of *Phaseolous vulgaris* in response to constitutive metabolites released by damaged bean cells. Physiol. Plant Pahtol. 1978, **13**: 89—100.

[29] Lyon, G. D. , Albersheim, P. Host-pathogen interactions XXI, Extraction of a heat-labile elicitor of phytoalexin accumulation from frozen soybean stems. Plant Physiol. 1982, **70**: 406—409.

[30] Dixon, R. A. , Dey, P. M. , Lawton, M. A. , Lamb, C. J. Phytoalexin induction in French bean, Intercellular transmission of elicitation in cell suspension cultures and hypocotyl sections of *Phaseolous vulgaris*. Plant Physiol. 1983, **71**: 251—256.

[31] Darvil, A. G. , Albersheim, P. Phytoalexins and their elicitors—a defense against microbial infection in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 1984, **35**: 243—275.

[32] Cartwright, D. , Langcake, P. , Pryce, R. J. , Leworthy, D. P. Chemical activation of host defence mechanisms as a basis for crop protection. Nature, 1977, **267**: 511—513.

[33] Sekizawa, Y. , Shimura, M. , Suzuki, A. , Iwata, M. Anti-conidial germination factors induced in the presence of probenazole in infected host leaves. Ⅱ. Structural elucidation of the major component (Substance B). Agric. Biol. Chem. 1981, **45**: 1437—1439.

[34] Shimura, M. , Iwata, M. , Tashiro, N. , Sekizawa, Y. , Suzuki, Y. , Mase, S. , Watanabe, T. Anti-conidial germination factors induced in the presence of probenazole in infected host leaves. I. Isolation and properties of four active substances. Agric. Biol. Chem. 1981, **45**: 1431—1435.

[35] Keen, N. T. , Horsch, R. Hydroxyhaseollin production by various soybean tissues: a warning against use of "unnatural" host-parasite systems. Phytopathology, 1972, **62**: 439—442.

[36] Yoshikawa, M. , Yamauchi, K. , Masago, H. Glyceollin: its role in restricting fungal growth in resistant soybean hypocotyls infected with *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Physiol. Plant Pathol. 1978, **12**: 73—82.

[37] Pierce, M. , Essenberg, M. Localization of phytoalexins in fluorescent mesophyll cells isolated from bacterial blight-infected cotton cotyledons and separated from other cells by fluorescence-activated cell sorting. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1987, **31**: 273—290.

[38] Peng, Y-L. , Luo, Z. -Q. , Shibata, D. , Terao, J. A new phytoalexin from rice. In Abstracts of the 7th Annual Meeting of Internatioinal Program on Rice Biotechnology. 1994, 256.

[39] Moesta, P. , Grisebach, H. L-2-aminnnny-3-phenylpropripanic acid inhibits phytolaexin accumulation in soybean with concomitant loss of resistance against *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, Physiol. Plant Pathol. 1982, **21**: 65—70.

[40] Van Etten, H. D. , Matthew, D. E. , Smith, D. A. Metabolism of phytoalexins. In: Phytoalxins (Bailey, J. A. , Mansfield, J. W. eds.). Blackie, 1982, 181—217.

[41] Schaffer, W. , Straney, D. C. , Van Etten, H. D. , Yoder, O. C. One enzyme makes a fungal pathogen, but not a saprophte, virulent on a new host plant. Science, 1989, **246**: 247—249.

[42] Kuc, J. , Currier, W. Phytoalexins, Plants and human health. Adv. Chem. Ser. 1976, **146**: 356—368.

[43] Smith, D. A. Toxicity of phytoalexins. In: Phytoalexins (Bailey, J. A. , Mansfield, J. W. eds.). Blackie, 1982, pp. 218—252.

[44] Peng, Y. -L. A molecular strategy to manipulate rice blast disease resistance, In: Integrated resource management for sustainable agriculture (Shi, Y. , Cheng, X. eds.). Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1994, 350—353.

[45] Kato, T. , Yamaguchi, Y. , Abe, N. , Uehara, T. , Namai, T. , Kodoma, M. , Shiobara, Y. Structure and synthesis of unsaturated thihydrooxy C18 fatty acids in rice plant suffering from rice blast disease. Tetrahedron Lett. 1985, **26**: 2357—2360.

[46] Kato, T. , Yamaguchi, Y. , Abe, N. , Uyehara, T. , Yokoyama, T. , Namai, T. , Yamanaka, S. Self defense substances in rice plant against rice blast disease. Chem. Lett. 1984, **25**: 409—412.

[47] Ohta, H. , shida, K. , Peng, Y. -L. , Furusawa, I. , Shishiyama, S. , Aibara, S. , Morita, Y. A. Lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Plant Physiol. 1991, **97**: 94—98.

[48] Ohta, H. , Shida, K. , Peng, Y. -L. , Furusawa, I. , Shishiyama, J. , Aibara, S. , Morita, Y. The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and relationship of such activity to the formation of antifungal substances. Plant Cell Physiol. 1990, **31**: 1117—1122.

[49] Peng, Y. -L. , Shishiyama, J. Temporal sequence of cytological events in rice leaves infected with *Pyricularia oryzae*. Can. J. Bot. 1988, **66**: 730-735.

[50] Peng, Y. -L. , Qin, Y. -P. , Huang, J. -B. Zeng, S. -M. Identification and partial purification of rice lipoxygenase and peroxygenase-like enzyme induced by the blast fungus. In: Abstracts of the 7th Annula Meeting of International Program on Rice Biotechnology, 1994, 127.

[51] Peng, Y. -L. , Shishiyama, J. Timing of a cellular reaction in rice cultivars associated with differing degrees of resistance to *Pyricularia oryzae*. Can. J. Bot. 1989, **67**: 2704—2710.

[52] Ohta, H. , Shida, K. , Shibata, D. cDNA cloning of rice lipoxygenase L-2 and characterization suing an active enzyme expressed from the cDNA in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 1992, **206**: 337—343.

[53] Peng, Y. -L. , Shirano, Y. , Ohta, H. , Hibino, T. , Tanaka, K. , Shibata, D. A novel lipoxygenase from rice. J. Biol. Chem. 1994, 3755—3761.

[54] Blee, E. , Schuber, F. Occurrence of fatty acid epoxide hydrolases in soybean (*Glycine* max.). Biochem. J. 1992, **282**: 711—741.

[55] Hamberg, M. , Hamberg, G. Hydroperoxide-dependent epoxidation of unsaturated fatty acid in the broad bean (*Vicia faba*). Arch. Biochem. Biophy. 1990, **288**: 409—416.

INDUCTION OF PHYTOALEXINS

Qin Yinping and Peng Youliang

Many high plants produce phytoalexins (PA) when they are attacked by pathogens or abiotic stimuli. On the basis of their chemical structure, PA can be classified into simple phenols, flavonoids, isoflavonoids, stilbenes, terpenes and polyacetylenes. So far, infection by fungi, bacteria, viruses or nematodes is found to be able to induce the production of PA in plants. There exist biotic and abiotic elicitors and they are possibly related as to their mechanisms inducing PA. Many studies showed that temporal and spatial accumulation of PA are coincident with *in vivo* inhibition of pathogen, suggesting that PA induction plays an important role in plant disease resistance. This conclusion was demonstrated by recent investigations such as expressing foreign genes encoding PA synthetase or detoxifying PA by engineered pathogen. According to previous results, we suggest that manipulating gene expression of a lipoxygenase pathway is a promising approach to obtain durable resistance against rice blast disease.

病程相关蛋白(PRP)诱导发生的分子生物学

王少华　董汉松　郑继法

一、概　　述

病程相关蛋白(pathogenesis-related protein,PRP,一般中译称为PR蛋白)是植物受病原物侵染或不同因子的刺激、胁迫产生的一类蛋白质。国内不同文献中有"病原相关蛋白"、"发病相关蛋白"等译法,"病程相关蛋白"为王金生所首倡[1],能确切地包容这类蛋白质在植物-病原物互作中的发生和作用。

PRP最早叫b蛋白,源于70年代初Van Loon和Van Kammen(1970)及Kassanis(1974)用多聚腺苷酸(PA)和病毒弱株系诱导烟草抗花叶病毒(TMV)的研究,在过敏反应(HR)和注射PA诱导的条件下,烟叶组织中产生几种可溶性蛋白质,在电泳图谱上分成迁移率不同的条带(band,b)[2]。1974－1980年间,在经不同因子诱导的烟草中发现的这类蛋白质已被分成b0、b1(b1′、b1″)、b3、b4等组群,这是最早使用的以蛋白质寄主来源(要在b前加寄主拉丁学名或英名的首写字母)和电泳迁移率为标准的分类方法[3]。此期对这类蛋白质的研究也多集中在诱导发生、生物物理和生物化学特性鉴定、以积累量与被诱导植物抗性加强程度之间的相关为指标的病理功能等方面,对它们的总体概念也有很多局限:b蛋白是一类具酸性、低分子量、存在于细胞间隙、抗蛋白酶、热稳定并抵抗不同金属离子等逆境条件等特性的诱导型蛋白质[4],除了以下将要谈到的这类蛋白质被赋予的特性之外,这套概念被扩展的最早原因是在植物细胞内发现了碱性的病程相关蛋白[5]。

最早使用"pathogenesis-related protein"这个术语的是Fraser(1981)[6],它不排除这类蛋白质不具有明确的抗病功能的可能性,带动了在植物种类和诱发因子种类两方面对PRP更广泛的研究。另一项起推动作用的研究是80年代中后期对PRP的定性,证明有些PRP是β-1,3-葡聚糖酶或几丁质酶[7,8],在这之前对这两种酶与PRP的研究"各行其事"。这种"对号入座"至少与以下3方面的研究密切相关:①从微生物中分离β-1,3-葡聚糖酶或几丁质酶及其基因用于植物转化的研究不仅被期望达到病害防治的实用目的,也有益于了解PRP的基因表达调控[9];②使不同研究者从蛋白质序列分析获得了NN型(对TMV过敏的显性基因)香料烟的大批cDNA克隆[10－18];③利用这些克隆通过转化表达(包括在微生物和烟草等植物中)和基因操作手段,对PRP诱导发生的遗传基础、编码基因的结构、基因表达和调控因子等研究,积累了不少结果[10,12,15,18]。这些结果使关于PRP病理功能的研究发生了或将发生以下变化[20－24]:①跳出验证PRP(以上两种酶为主)功击病原物等功能的假设和表型相关的设想这一框架,注意对非酶PRP作用的研究;②对PRP编码基因的"分工负责"机制的了解,尤其是对接受诱导的靶顺序(target sequences,TS,主要指应激反应元件responsive element)的了解,使人们注意从植物体内发现这种诱导信号,并注重诱导的持续性和刺激的"链反应"(response sequences),例如内

源激发子(endogenous elicitor)的作用;③从不同来源的 PRP 氨基酸顺序和其基因的核苷酸顺序的同源性和保守性出发可以作一个大胆的设想:从 PRP 基因中找到能接受特定因子刺激的 TS,通过对这个顺序的刺激来启动植物对不同病原物的抗性。以上种种,都是目前关于 PRP 研究的"热点"。

本文将介绍关于这些"热点"的研究进展,谈到的内容主要有 PRP 的生物化学特性、病理功能、诱导因子(信号)、基因表达调控等。

二、生物学和生物化学特性

1. 组群

近 20 年期间,在不断发现存在于植物细胞间的酸性 PRP 的同时,相继在烟草等植物中分离到存在于液泡中的碱性 PRP;对 PRP 基因组的分离、克隆、表达的研究也不断深入,形成了目前按 PRP 的植物来源、电泳迁移率(分子量)、血清学关系以及氨基酸序列的同源性为标准的分类体系。烟草是目前 PRP 发现数目最多、研究最清楚的植物,对这些蛋白质的划分,不同的研究小组采用不同的名称,这里采用 Fritig 等[25]经 TMV 诱导的 Samsun NN 烟草分类体系(表 1)。

同时,继双子叶植物之后,PRP 又在单子叶植物中发现,至今已在近 20 种植物中分离到不同的 PRP,并对其中某些 PRP 做了定性或基因的克隆、分离(表 2)。

表 1 TMV 诱导的 Samsun NN 烟草中的 PRP

Table 1 PR proteins induced in Samsun tobacco(NN genotype) by TMV infection (from Bol et al. ,1990)[26]

组群	酸性 PRP		碱性 PRP		功 能
	名称	分子量	名称	分子量	
1	1a 1b 1c	15.8 15.5 15.6	16kd	16.0	未知
2a	2 N O Q'	39.7 40.0 40.6 36.0	Gluc. b	33.0	β-1,3-葡聚糖酶
2b	O'	25.0			β-1,3-葡聚糖酶
3	P Q	27.5 28.5	Ch. 32 Ch. 34	32.0 34.0	几丁质酶
4	s1 r1 s2 r2	14.5 14.5 14.5 13.0 13.0			
5a	R S	24.0 24.0	Osmotin	24.0	未知 类甜蛋白 (TLP)
5b			45kd	45.0	未知

表 2 某些植物中的 PRP 举例

Table 2 PR proteins in some plant species

植物种类	PRP 和功能
1. 马铃薯[27]	2 种碱性 β-1,3-葡聚糖酶 6 种碱性几丁质酶
2. 菜豆[28]	1 种几丁质酶 1 种 β-1,3-葡聚糖酶
3. 豌豆[29]	2 种酸性 β-1,3-葡聚糖酶 2 种碱性几丁质酶
4. 黄瓜[30]	1 种酸性几丁质酶
5. 大麦[31]	1 类 β-1,3-1,4-葡聚糖酶(E Ⅰ,E Ⅱ) 1 类 β-1,3-葡聚糖酶(G Ⅰ,G Ⅱ) 1 种内几丁质酶
6. 玉米[8]	8 种名命为 PRml—PRm8 的 PRP 其中 PRm3,4,5,7 是内几丁质酶

2. 生物化学和分子结构特性[2-4,26,32]

1) PRP 分子量相对较小,一般为 10—40kDa,是单体,不是糖蛋白,这有利于 PRP 在细胞内的转移。

2) PRP 有酸性、碱性之分,在烟草中发现的绝大多数是酸性蛋白质;酸、碱两类 PRP 的前体构成、定位、作用各不相同。

3) PRP 有较强的稳定性,在低 pH 值下仍保持可溶;抗蛋白酶降解;半衰期约 40—70 小时,所以可以在胞内胞间很好地积累;大部分 PRP 能抵抗糖苷酶、重金属、高温(60℃),但并非所有 PRP 都有这些抗性。

4) 诱导的 PRP 活性存在差异,第三组中的 PR-P 和 PR-Q 占所有烟草经 TMV 诱导产生的几丁质酶的 1/3,但二者的活性是碱性几丁质酶 Ch. 32 和 Ch. 34 的 1/6。

5) 有少数研究表明 PRP 在植物体内的消失是因为被降解,例如,一种 37kDa 的预存性胞间蛋白酶,可以降解番茄的 P14[33]。

6) PRP 在进化上相对保守。在由不同胁迫诱导的植物可溶性蛋白质中,PRP 占 10%;目前已有 20 多种植物被证明可以产生 PRP,其中几丁质酶已从黄瓜、甜瓜、胡萝卜、欧芹、拟南芥、马铃薯、烟草等 10 多种作物中分离到,这些来源不同的 PRP 显示程度不等的序列同源性。例如,来自烟草不同品种的 PR-1 酸性蛋白质很少有差异,并同碱性 PRP 之间有 67%的同源性,有相似的血清学反应。许多 PRP 在血清学关系、氨基酸组成、分子结构、理化性质上都有相似之处,这都说明 PRP 在进化上的保守性及在植物发育和抗病害防卫共同机制上的重要性。

3. 在植物体内的定位和形成过程

用细胞分离技术、免疫荧光显微技术、免疫金标记技术等研究表明,PRP 首先在细胞内合成,然后按特定机制运转到细胞间隙或液泡中,并在其中定位。在烟草中,酸性和碱性 PRP 分别严格地定位在胞间和液泡内,其中渗透素(osmotin)在液泡的内含体内集中[34]。在其他作物上情况有所不同,番茄的 P14 有双重定位,可存在于胞间和胞内[35];在马铃薯中,已发现的碱性 PRP 都是在胞间[33]。人们认为,胞间的酸性 PRP 对病原物的入侵是第一道障碍,胞内碱性 PRP 是第二道障碍[35]。

PRP 在细胞内的转移取决于它们的末端顺序。酸性、碱性 PRP 的一个重要的结构区别在于碱性 PRP 的前体不但有 N 端信号肽，还有 C 端糖基化的尾巴序列，而在成熟蛋白质中这两个末端序列在 C 端糖基化的同时都要被切去[26]。公认 C 端糖基化只对 PRP 的稳定性起保护作用，而 N 端信号肽在 PRP 定位中的作用一直是人们研究的热点，例外是欧芹 PR1(16.6kDa，Pi4.7)，它无信号肽，同已发现的 PRP 没有同源性，定位于细胞质中[36]。所有知道的其他 PRP 前体都含 N 端信号肽，在这段信号肽中，除了其疏水性和在一定的位置上的残基外，很少有同源性。有人认为，N 端信号肽可能与 PRP 多肽链通过内质网的转移有关，决定其是否从高尔基体转到液泡中或穿过细胞质膜分泌到胞间；PRP 前体靠近 N 端的信号专门负责控制 PRP 向液泡中运转，它的缺失可使运转途径发生错误而分泌到胞间[26]。烟草碱性几丁质酶含有一个在酸性几丁质酶中所没有的 46 个氨基酸的 N 端顺序，但它似乎并不能指令这种 PRP 运转到液泡中，因为在定位于胞间的马铃薯碱性几丁质酶中也发生类似的 N 端顺序。这就是说，靠近 N 末端的信号肽对 PRP 的运转去向具有特异性指令功能。

三、诱导发生和病理功能

1. 诱导因子

PRP 可以被不同的诱导因子所诱导，这些诱导因子大致可分为外源激发因子和内源激发因子，这是为了叙述方便而非严格的激发子(elicitor)概念，有关 elicitor 的界定已在其他篇目给出。外源激发因子主要包括病原物侵染(例如最早也是最受注意的病毒诱导 HR 的过程中产生 PRP)、化学物质(如钡盐、锰盐、乙烯利、水杨酸等)、创伤(如昆虫所造成的创伤)以及从真菌中提取的外源激发子(elicitor)等[23,26,37,38]。内源激发因子是指植物体内在抗病防卫或植物-病原物互作过程中产生的有诱导 PRP 作用的分子，如乙烯、H_2O_2、其他激素及从病原物或植物细胞壁上酶解产生的激发子。值得指出的是，和其他防卫反应一样，PRP 的诱导积累总是和植物的 HR 伴随发生。下面略举几例。

水杨酸(SA)作为外源激发因子可以诱导许多植物 PRP 及其 mRNA 的积累，引人注目的是 SA 作为内源激发因子对诱导 PRP 所起的作用[39-41]。在 Xanthic-ncNN 烟上，TMV 引起 HR 反应并伴有 PR-1 的诱导，内在水平的 SA 也增高 10—100 倍，并且 SA 量增高伴有 PR-1 的被诱导只发生在 Xanthuic-ncNN 烟上，不发生在 TMV 感染的 nn 烟上，表明在此内源激发因子、PRP 和 HR 间是一种正相关关系。在 32℃高温时 Xanthic-ncNN 烟对 TMV 产生 HR 的能力丧失，侵染变成系统性，是因为高温下植物不能积累内在水平的 SA，从而不能诱导积累 PR-1 的结果。计算机模式分析发现 SA 在韧皮部移动很快，有人认为 SA 作为一种信号分子是以一种糖结合的形式运输的[40]，但最近有证据表明它的运转受体是蛋白质[39]。

另一个例子是用木聚糖酶注射烟草诱导 PRP 产生，表明其释放的寡聚糖片段可能作为信号分子起作用[42]。在番茄、马铃薯叶片上，由伤口处理的系统诱导是通过内多聚半乳糖酶降解植物细胞壁而释放出来的寡聚糖作为信号来传导的，并且这种系统诱导所产生的蛋白质可以抑制动物、微生物中常有而植物中少有的丝氨酸肽链内切酶[43]。在菜豆中，β-1,3-葡聚糖酶释放的激发子可以诱导植物保卫素合成[44]。

2. 信号传递链中的相关反应

从外源激发因子到植物抗病防卫反应的功能因子(概念见本书绪论,董汉松)的诱导积累是一种链反应,大致程式是:一级信号(外源激发因子)→二级信号(内源激发因子)→三级信号(?)→防卫反应基因活化→防卫反应功能因子诱导合成、积累。其中乙烯、其他激素、H_2O_2 显示出作为二级信使的重要作用,由它们接力诱发的功能因子有木质化、HRGP、PRP、PAL 及其代谢中的酶、SOD 及过氧化物酶等,这些因子在抗病防卫中或各自担负特定功能,或有序协作、共同对付病原物的不同致病机制。

3. PRP 的病理功能

(1) 总况:植物在抗病防卫反应过程中产生的担负一定功能的蛋白质至少有 3 类。一类是富羟糖蛋白(HRGP),主要作为细胞壁上的大分子实现多糖(如果胶、纤维素)和多酚化合物(如几丁质、木栓质)的联结和细胞间联结,从而对病原物侵染和扩展起到机械屏障的作用(梁元存等)。另一类是各种有明确功能的酶,例如,多酚氧化酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶、苯丙氨酸氨裂解酶及类黄酮植物保卫素合成中的关键酶,如查尔酮合成酶及异构酶等(徐文联等)。再一类就是 PRP,最具区别性的特征是它们的严格定位和抗逆性。在 PRP 的 5 个组(表 1)中,已明确功能的第 2 组(葡聚糖酶)和第 3 组(几丁质酶)有被单独分列作为抗病防卫反应功能分子加以考察的倾向[38]。综合起来看,PRP 的功能或可能的功能有攻击病原物、降解细胞壁大分子而释放二级(内源)激发子、毒素解毒酶、病毒外壳蛋白的结合或抑制蛋白、二级信使分子等[22-24,37,43,45]。

(2) 各组 PRP 病理功能分述:

1) PR-1 组:表 1 所列 PR-1a、PR-1b、PR-1c 属功能未明、富含甘氨酸的 PRP,它们都发生在 NN 型香料烟(samsun)对 TMV 的 HR 过程中,并被水杨酸诱导[46],说明这组 PRP 至少具有抗病毒功能。但除了在表型上有一些 PRP 积累与 HR 及抗后攻病毒能力增强的间接证据外,尚无充分证实它们的抗病毒功能,同时,以 PRP-1(和 GRP、PR-S)为目的基因的转基因烟草虽有这类蛋白质的表达,但并不能增强对 TMV 和苜蓿花叶病毒(AMV)的抗性[47]。有人认为它们可能参与植物细胞壁抗侵染的作用[20];Linthorst 等[47]认为这组 PRP 可能是靠协同作用才能抵抗病毒;*Nicotiana glutinosa* 与 *N. debneyi* 的种间杂交子可以组成性地表达 PR-1 类蛋白质,同时对 TMV 和 TNY(烟草坏死病毒)显示很强的抗性[48]。李怀方[49]指出,这组 PRP 可能同由 Ca^{2+} 参与的离子通道防卫有关,即使 Ca^{2+} 浓度很低,PR-1 仍显示很强的结合能力,他因此推论,PRP 在细胞内有较强结合位点,对病毒螯合 Ca^{2+} 有竞争作用并参与对钙调蛋白的调控;在细胞外可以大量结合 Ca^{2+},参与病毒局限化,并导致细胞膜外电阻升高,引发更多的防卫反应。

2) PR-2 组和 PR-3 组:80 年代中后期首次证明 PRP 中的两类分别是 β-1,3-葡聚糖酶和几丁质酶[7,8],在 Fritig 等的体系中归为第 2 和第 3 组(表 1)。几丁质酶催化几丁质大分子中 β-1,4 联结的 N-乙酰-D-葡糖胺,这种结构的大分子是许多真菌细胞壁的主要成分(参见张中义等[51],10—11 页,表 3),而不存在于高等植物的细胞壁中。β-1,3-葡聚糖酶降解胼胝质(β-1,3-葡聚糖);β-1,3-葡聚糖广泛存在于植物体内细胞如维管束系统细胞中,也是真菌细胞壁的主要成分[38]。一个较早的、合理的推测是:两种酶都可以攻击病原

真菌，几丁质酶可以对真菌细胞壁、β-1,3-葡聚糖酶既可以对真菌，也可以对植物细胞壁酶解而释放二级(内源)激发子。对此已获得较多的证据(表3)[51]，但由于人们的兴趣越来越集中到对PRP与其他种类诱导型蛋白质之间的同源性所可能包含的更多的意义以及它们的表达调控方面，对这两种功能应该很明确的酶在抗病防卫中的作用，反而没有持续积累更丰富的证据。

3) PR-4组：功能不明，在烟草中可为TMV侵染所诱导，与外源凝集素hevein (Win-1和Win-2)的C端主体序列同源[45]，表明可能参与对病原细菌的非亲和识别(参见文献[55])。对它们与PR-2组的血清关系也尚未肯定，Van Loon等与Kauffmann的结果正好相反[26]，所以很难推断它们具有β-1,3-葡聚糖酶活性。

表3 几丁质酶、β-1,3-葡聚糖酶及相关PRP病理功能

Table 3 Examples of pathological roles of chitinase(Ch), β-1,3-glucanase(Glu) and the homlogous PR proteins

植物	PRP	病理功能	研究者
烟草(NN香料烟)	①Ch	攻击 *Fusarium solani*(Fs)	Ponstein 等 (1994)[20]
	②Glu	攻击Fs和 *Alternaria radicina*(Ar)	
	③CBP20	攻击Fs和 *Trichoderma virid*(Tv)	
	①+③	协同增强，攻击Fs	
	②+③	协同增强，攻击Fs和Tv	
烟草(烤烟)	Glu Ch	酶活性与对 *Peronospora tabacina* 的抵抗及寄主抗病性提高在动态上一致 无上述一致性	Kuc 实验室 (1989)[38]
番茄	P14a Glu Ch	三类PRP在抗 *Phytophthora infestans* (Pin)过程中积累，但未明确各自的作用多大	Cohen 等 (1994)[37]
	Glu	参与番茄-*Cladosporium fulvum* 非亲和互作的防卫因子	Joosten 和 De Wit(1989)[52]
	Glu	提纯后部分分解 *Verticillium alboartrum* (*Vaa*)细胞壁	Young 和 Pegg (1982)[53]
	Glu+Ch	增强对Vaa细胞壁的分解能力	
菜豆	Ch (来自豌豆)	至少部分地参与对Fs的抵抗作用(其他因子有PAL、CS等)(注意：只是推测)	Fristensky 等 (1988)[53]
大豆	Glu	酶解真菌细胞壁、释放激发子、诱导植物保卫素	Ham 等 (1991)[43]
玉米	TLP类 PRP(22kDa)	抑制 *F. oxysporium* 和 *A. solani* 生长(说明：可能并不是酶解病菌的细胞壁，因为这种PRP与α-淀粉酶抑制剂胰蛋白酶有99%的同源性，所以可能是干扰了细菌的代谢，与PR-5组功能类似，如抗虫)	Huynh 等 (1992)[24]

4) PR-5组：即被称为类甜蛋白的PRP(thaumatin-like protein, TLP)，主要是24kDa的蛋白质，包括PR-S、PR-P和碱性osmotin Ⅰ、Ⅱ，发生情况可参见刘长征的叙述。它们与甜蛋白有血清学关系，但无甜味；与玉米中的胰蛋白酶和昆虫中的α-淀粉酶的抑制剂有高度同源性，但纯化后并不抑制这两种酶[21]。类似的蛋白质可在禾本科、豆科、茄科植物的种子、块茎中检测到；在经伤口系统诱导的番茄、马铃薯叶片中也发现了类似PRP，可以激活某些抵抗丝氨酸肽链内切酶的蛋白质[43]。以下推测是有道理的：PR-5组蛋白质

除了与植物抗虫有关外，可能还参与植物-病原物互作中的有关代谢和抑制病原物酶的作用。

四、PRP的基因结构和表达调控

1. 基因结构和表达调控的一般特征

1）所有PRP都是多基因编码，通常称为基因集团或基因家族(gene family)，因此有PR-1、PR-2直到PR-5基因家族的称谓；同一基因家族其cDNA或DNA基因组有数目不等的核苷酸顺序同源[14,15,36,58]。

2）不同基因家族可以接受同一个(种、类)刺激信号而激活表达。当使用一种以上信号刺激时，不同家族的激活表达可以是同步的和协调的，也可以是相互抑制的[23,28,37,57]。

3）同一个基因家族包含多个基因成员，每个成员负责对一种或一种以上刺激信号作出反应，反应可以是正向的(基因活化，PRP合成、积累)，也可以是反向的；不同基因成员同时或不同时为某种信号刺激而同步表达，它们之间也有相互抑制或增强的现象[13,23,35,37,46]。

4）同一个基因成员的核苷酸序列有特定的功能分区，可以包含启动子、靶位和结构(功能)顺序。靶序(target sequence，TS)最本质的组分是反应元件(responsive element)，有的还含有增强子(enhancer)顺序[13,46,57]。

5）TS对不同刺激信号表现出严格的选择性，如番茄的3种PRP(P14a、β-1，3-葡聚糖酶、几丁质酶)对氨基丁酸的α、β、γ异构体反应的差别可以达到86%[37,57]。

6）至少一部分基因成员的上游区含有不同长度的反向重复顺序，被认为对表达可能起调控作用。还可以含不同长度的内含子(intron)，它的长短显示出与接受或不接受某种刺激信号有关，也就是对TS起调控作用。如NN型烟草的GRP-8其内含子长555bp，能对TMV侵染作出反应，而GRP-4的内含子长1954bp，不受TMV侵染激活[56]。同时，有些基因的内含子是其他基因的功能成分(外显子，exon)[18,26,35,57]。

7）所有发现的PRP基因家族或其成员的诱导表达调控都是在转录水平上，也就是诱导刺激并不导致密码子重排(即新基因产生)[12,13,23,35,58]。这种现象对所有诱导性蛋白质如HRGP、PAL等及防卫功能事件如植物保卫素、异黄酮类植物保卫素合成中的査尔酮系列酶的诱导都是共同的，适成对比的是，*C. fulvum*的*avr*基因一个碱基对的变化就可以使它从原来对番茄的不亲和变成亲和，而这种变化可以在自然条件下发生[59]。

8）与植物其他诱导性蛋白质一样，PRP的诱导发生遵循一套大致相似的表型机制[39-42,60]：从施加的诱导刺激(一级信号)到TS接受这种刺激，通常存在一个二级(次级)信使传导过程，其中最重要的是水杨酸；受植物生长发育调节并表现出一定的组织或器官特异性；受某种激素的调节，有些激素如乙烯不仅仅是作为信号传递中的次级信使而起作用；有的还受以光强度为主的环境因子调节等。

对以上这些特性，需作两点补充说明。第一，这些特性到目前并不是在每个基因家族或其基因成员中都得到证实，但很可能是共同的规律，不仅对PRP，而且对其他诱导性蛋白质。因为对这些特性的认识差不多只是在最近五六年时间内积累起来的，而且差不多是采用一套一致的分子生物学研究程序，例如，用分段内切、转化表达分析基因的TS或反

应元件；嵌合基因（通常是重组质粒）中的启动子也都是外源的（如 35S），以及最常用的报道基因都是 Gus。第二，对以上所列特性的的证据，读者可从本文下一节“分述”中见到，但对有些所谓“共同规律”，我们建议参阅《植物诱导性抗病因子》和《富羟糖蛋白（HRGP）及其抗病防卫功能》，因为我们把每种防卫反应功能因子都放在抗病防卫的链反应中加以考察。

2. 主要基因家族分述

（1）PR-1 族和 GPR 族：对 PR-1 组的酸性和碱性 PRP，至少已有 9 个基因成员得到比较详细的定性研究。其中 8 种基因来自 NN 型香料烟（Samsun 或 Xanthi），无论是编码碱性还是编码酸性 PR-1 组 PRP 的基因，都可以由水杨酸诱导表达，但 TMV 侵染只启动酸性 PR-1 的 3 种、碱性 PR-1 的 2 种基因[61]。第 9 个基因成员从烤烟中分离到，包括编码碱性和酸性 PR-1 的基因，二者都是以乙烯作为二级（次级）信使发生调节，但既有共同处又有明显不同[23]：当用木聚糖酶（它可能需要释放二级激发子）作为一级激发子时，酸性和碱性的编码基因可以不依赖光照而表达，而用 α 氨基丁酸为一级激发子时，二者的表达都需要光照，同时，在这两种情况下，都由乙烯担当次级信使；但是，当用乙烯作为一级信号（激发子）时，只有编码碱性 PR-1 的基因表达，这也是一个需要光照的过程。这一研究的意义是：至少来自烤烟的这个 PRP-1b 基因成员，也可能所有 PR-1 基因家族（参见表 4，碱性 PR-1a 的“调控区别”一栏），其功能更可能是参与植物与环境的互作[22-24]。

表 4 PR-1 基因家族的主要成员及其特性

Table 4 The well-characterized members in PR-1 gene family

基因成员	来源植物	一级信号	调控区别	研究者
碱性：				
PR-1a	*Nicotiana sylvestris*	TMV 侵染、SA	不依赖 Au、CTK，受植物生长调节	Uknes 等 (1993)[57]
PR-1b	*N. tomentosiformis*	TMV、SA		
PR-1c	*N. sylvestris*	SA	外源 ET 诱导，需要光照	Payne 等 (1989)[61]
PRB-1b	*N. tabacum*	ET		
		α-Amb	ET 作为二级信使，需要光照	
		Xyl	ET 作为二级信使，不需光照	Eyal 等 (1992)[23]
酸性：				
PR-1a	*N. sylvestris*	TMV、SA		Cornelissen 等 (1987)[62]
PR-1b	*N. tomentosiformis*	TMV、SA		
PR-1c	*N. sylvestris*	TMV、SA		Eral 等
		α-Amb	ET 作为二级信使，需要光照	(1989)[61]
PRB-1b	*N. tabacum*	Xyl	ET 作为二级信使，不需光照	Uknes 等 (1993)[57]

注：SA（salicylate），水杨酸；Au（auxin），生长素；CTK（cytokinin），细胞分裂素；ET（ethylene），乙烯；α-Amb（α-amino-butyric acid），α 氨基丁酸；Xyl（xylanase），木聚糖酶。

对这族基因组织和功能分区情况的了解大致如下：PR-1a 碱性和酸性 PRP 的编码基因间在 5′端有侧序同源性，但没有明显的重复序列，碱性与酸性 PR-1a 的基因并不同步表达[61]。在 Uknes 等[57]转化烟草的试验中，碱性 PR-1a 基因的这段侧位序列长 661bp，显示为接受水杨酸和 TMV 侵染刺激的全长序列（即并未区分开反应元件和加强子等的分区）。Bol 等（1990）[26]明确 PR-1a 基因在上游区的 689bp 序列中，－689——643bp 序列为

接受 TMV 和水杨酸刺激的有效 TS(47 个 bp)，即反应元件，位于该基因的 TATA 盒附近；另外含有一段类似 SV40 的增强子顺序。

GRP 即富含甘氨酸的蛋白质(注意，有的作者并不把 GRP 归在 PRP 中)，基因家族至少含 8 个基因成员，都可以为水杨酸诱导而表达，但当受 TMV 侵染刺激时，只有 4 种基因被激活。目前了解比较清楚的是它们的两个克隆 GRP-4 和 GRP-8，各含有与对 TS 调控有关(见上)的 1954bp 和 555bp 的内含子。在它们上游序列的 645bp 长的区域内，对 TMV 侵染和水杨酸刺激的 TS(246bp)处在－645——－400 之间，也包含类似 SV40 的增强子顺序[63]。这就是 GRP 基因家族和 PR-1 家族对 TMV 侵染和水杨酸刺激显示相似的接受能力的原因。

(2) PR-2 族和 PR-3 族：

1) 烟草：在 NN 型 Samsun 烟草中，酸性和碱性的 β-1，3-葡聚糖酶基因至少含有 8 个基因成员，酸性酶的基因受 TMV 侵染后大多都表达，同样条件下碱性酶基因只有 3 种表达[67]。从 *N. plumbaginifólia* 克隆的一种葡聚糖酶基因，在信号肽编码序列内的开放阅读框附近含一个长 669bp 的内含子[64]。

酸性和碱性几丁质酶的编码基因至少有 2—4 个成员，可接受 TMV 刺激而表达[65]。对它们的基因结构和表达调控了解甚少，Ernst 等(1992)[22]表明臭氧刺激可使碱性几丁质酶基因转录在白肋烟 W3 中略有增强，在有的烟草品种(如白肋烟 B)则被强烈诱导；在同一个试验中，碱性的 β-1，3-葡聚糖酶、酸性几丁质酶和 PR-1b 的基因均被不同程度地诱导表达，他们因此认为 PRP 基因还具有抗氧化胁迫的功能。

2) 菜豆：在菜豆中，至少 3 种已知的几丁质酶基因中的两种(CH5B、CH5A)受乙烯调节。这两种基因上游区含有两个保守区段，区段 α 在 CH5B 中位于－927——1470bp 之间，在 CH5A 中位于－553——1200 之间，二者有 96%的序列同源。区段 Ⅱ 由两段长 13bp 和 43bp 的延长序列组成，相互间高度保守，CH5B 的这两个延长序列分别位于－252——264和－181——223bp，而在 CH5A 中的位置更靠近上游。转化试验(CH5B-promoter/Gus fusions)结果表明，区段 I 不能对乙烯刺激作出反应，－422——195bp 的区域是 CH5B 对乙烯的反应元件，－575——422bp 是一个加强子序列[66]。

(3) PR-4 族和 PR-5 族：对 PR-4 基因的研究很少。根据 Friedrich 等(1991)[45]的研究结果，从 PR-4 蛋白结构推断它们的基因末端(对应于 N 端)序列与 PR-3(几丁质酶基因)有相似的组织形式，转录表达受 TMV 侵染刺激，表达的时序性也与其他 PRP 相似。

对 PR-5 族，从烟草基因组中已钩出编码 PR-P 和 PR-S 的基因克隆，均知其含阅读框架，它们的上游区段至少有 1kb 的顺序同源，但与 PR-1a、GPR 只在转录起点上游区最前面的 100bp 内有很低的同源性；两个基因都含有接受 TMV 侵染刺激的反应元件[67]。

3. PRP 基因的组成性表达及意义

Bol 等 1990 年在他们的综述[26]中介绍了 PRP 基因在转基因植物中的表达情况，着眼点主要放在评价 PRP 的抗病功能。期望通过这类基因的转化改善作物抗病性，差不多是当时以 PRP 基因为目的基因的植物转化所要达到的主要目的。此后几年，为此实用目的所做的转基因研究的报道很少增加，人们的兴趣 转到通过转化表达来了解 PRP 基因的组成和调控，这当然也是由于人们认识到必须先弄清基因的表达调控机制才能实现最

有效的转化(改善作物抗病性),从而使实用目的基因工程"降温"的一种表现。

总起来说,PRP 基因在转基因植物(主要是 NN 型香料烟)中的表现有 4 方面:①排除了它们以交叉保护原理(阻止病毒脱衣壳或粒体装配)所起的抗病毒作用[19,47];②表明某种 PRP 基因的导入对其他 PRP 基因有一定影响,多数是增效[19,68];③PRP 的纳入对嵌合基因中的其他基因的表达有影响,多数是增效,如 PR-1 基因转化烟草对同时转入的 TMV 外壳蛋白基因表达起增强作用[19];④明确了 PRP 基因的表达受植物生长发育调节,并具有器官或组织特异性[68]。所以很明显,使 PRP 基因在转基因植物中组成性表达的意义在于了解 PRP 的功能和它们的基因表达调控的机制,而短期内很难接近实用目标。

另有 3 种类型的组成性表达似乎更接近实用目标。一种是种间杂交子后代,例如,*N. glutinosa*×*N. debenyi* 的杂交(原生质体融合,亦即体细胞杂交的再生植株)后代,其 PR-1 的组成性表达明显增强对 TMV 的抗性[48];另一种是在胁迫条件下经组织培养产生的再生株后代,如烟草用 AT 毒素胁迫的组织培养产生的抗病无性系 NC89-TT;第三种是事先用病毒诱导的植株经组织培养产生的抗病无性系 NC89-V1 和 NC89-V2,这两类无性系都表现出对不同病害的多抗性,酸性 PRP 也呈程度不等的组成性表达。在以上 3 种情况下,植物组织或细胞都经过一个体细胞无性系变异(SV)过程,其中必定有某种机制使转录水平上被激活的基因经 SV 的影响而由原来的表型不遗传变成可遗传(均见"烟草诱导抗病性"部分有关篇目)。

五、结　　语

PRP 是植物诱导抗病性所包括的功能分子中研究最细致的一类,但有许多问题并未得到解答:PRP 在植物与病原物共同进化中的渊源和二者互作中的地位;每一组 PRP 具有怎样的功能;上述信号传递的真实细节,功能事件启动的时序;PR 基因的分工负责及成员间的相互关系;被忽视的经 SV 途径组成表达的意义,尤其是最有诱惑力的 TS 顺序是否可以人工"打开"等等。已有的研究表明,对这些问题最终会得到解答。

参 考 文 献

[1] 王金生,寄主-病原物互作,植物病理学报,1992,**22**:289—293。

[2] Van Loon,L. C. ,Van Kammen,A. ,Polycarylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. *samsun* and Samsun NN. **I**. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus,Virol. ,1970,**40**:191→211.

[3] 张学君,植物中与病程相关的蛋白质,世界农业,1991,**8**:35—36。

[4] 杜良成、王　钧,病原相关蛋白及其在植物抗病中的作用,植物生理学通讯,1990[4]:1—6。

[5] Roggero,P. ,Pennazio,S. ,The extracellular acidic and basic pathogenesis-related proteins of soybean induced by viral infection,J. Phytopathol. ,1989,**127**:274—280.

[6] Fraser,R. S. S. ,Evidence for the occurrence of the pathogenesis-related proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering,Physiol. Plant Pathol. ,1981,**19**:69—76.

[7] Kauffmann,S. ,Iegrand,M. ,Geoffroy,P. ,Fritig,B. ,Biological function of 'pathogenesis-related' proteins:Four PR proteins of tobacco have β-1,3-glucanase activity,EMBO J. ,1987,**6**:3209—3212.

[8] Nasser, W., de Tapia, M., Kauffmann, S., Montasser-Kouhsari, S., Burkhard, G., Identification and characterization of maize pathogenesis-related proteins. Four maize PR proteins are chitinases, Plant Mol. Biol., 1988, **11**: 529—538.

[9] Sundheim, L., Polawski, A. R., Ellingboe, A. H., Molecular cloning of two chitinase genes from *Serrata marcecens* and their expression in *Pseudomonas* species, Physiol. Mol. Plant Pathol., 1988, **33**: 183—191.

[10] Bol, J. F., van Rossum, C. M. A., Cornelissen, B. J. C., Linthorst, H. J. M., Induction of host genes by the hypersensitive response of tobacco to virus infection. 3rd Int. Workshop on PR Proteins in Plants, Arolla, Switzerland, 1992, 1—12.

[11] Broglie, K. E., Gaynor, J. J., Broglie, R. M., Ethylene-regulated gene expression: Molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, **83**: 6820—6824.

[12] Hedrick, S. A., Bell, J. N., Boller, T. et al., Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding, and infection, Plant Physiol., 1988, **86**: 182—186.

[13] Hooft van Huijsduijnen, R. A. M., Loon, L. C., Bol, J. F., cDNA cloning of six mRNAs induced by TMV infection of tobacco and a characterization of their translation products, EMBO J., 1986, **5**: 2057—2061.

[14] Matsuoka, Mj., Yamaoto, N., Kano-Murakami, Y., Tanaka, Y., Ozeki, Y., Hirano, H., Kagawa, H., Oshima, M., Ohashi, Y., Classification and structural comparison of full-length cDNAs for pathogenesis-related proteins, Plant Physiol., 1987, **85**: 942—946.

[15] Metraux, J. P., Burkhart, W., Moyer, M., Dincher, S., Middlesteadt, W., Williams, S., Payne., G., Carnes, M., Pyals, J. Isolation of a complementary DNA encoding a chitinase with structural homology to a bifuncitional isozyme/chitinase, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1989, **86**: 896—900.

[16] Payne, G., Parks, T. D., Burkhart, W., Isolation of the the genomic clone for pathogenesis-related protein la from *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc, Plant Mol. Biol., 1988, **11**: 89—94.

[17] Pfitzner, U. M., Goodman, H. M., Isolation and characterization of cDNA clones encoding pathogenesis—related proteins from tobacco mosaic virus infected tobacco plants, Nucleic Acids Res., 1987, **15**: 4449—4465.

[18] Pfitzner, A. J. P., Beilmann, A., Goodman, H. M., Molecular analysis of two PR-1 pseudogenes from tobacco, Plant Mol. Biol., 1991, **16**: 129—139.

[19] Carr, J. P., Beacy, R. N., Klessig, D. F, Are the PR 1 proteins of tobacco involved in genetically engineered resistance of TMV? Virol., 1989, **169**: 470—473.

[20] Ponstein, A. S., Bres-Vloemans, S. A., Sela-Burlage, M. B., Elzen, P. J. M., Melchers. L. S., Cornelisen, B. J. C., A novel pathogen- and wounding-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity, Plant Physiol., 1994, **104**: 109—118.

[21] Pierpolint, W. S, Gordin-Weeks, R., Jackson, P. J., The occurrence of the thaumatin-like pathogenesis-related protein, PR-5, in intercellular fluids from *Nicotiana* species and from interspecific *Nicotiana* hybrid, Physiol. Mol. Plant Pathol., 1992, **41**: 1—10.

[22] Ernst, D., Schraunder, M., Iangebartels, C. Sandermann, H.-Jr., Ozone-induced changes of mRNA levels of β-1,3-glucanase, chitinase and 'pathogenesis-related' protein 1b in tobacco plants, Plant Mol. Biol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Genet. Eng., 1992, **20**: 673—682.

[23] Eyal, Y., Sagee. O., Fkuhr, R., Dark-induced accumulation of a basic pathogeesis-related (PR-1) transcript and a light requeirement for its induction by ethylene, Plant Mol. Biol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Genet. Eng., 1992, **19**: 589—599.

[24] Huynh, Q. K., Borgmeyer, J. R., Zobel, J. F., Isolation and characterization of a 22kDa protein with antifungal properties form maize seeds, Biochem. Biophys. Commu., 1992, **182**: 1—5.

[25] Fritig, B., Kauffmann, S., Stinzi, A., Geoffroy, P., Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions, NATO AST Ser, H: Cell Biol. Vol. 36 (Lugtenberg, B. J. J., ed.), Wien: Springer-Verlag, 1989, 161—168.

[26] Bol, J. F., Linthorst, J. M., Cornelissen, B. J. C., Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection, Annu. Rev. Phytopathol., 1990, **28**: 113—138.

[27] Kombrink, E. , Scroder, M. , Hahibrock, K. , Several"pathogenesis-related"proteins in potato are 1,3-β-glucanases and chitinases, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, **85**: 782—786.

[28] Vogeli, U. , Meins, F. , Boller, T. , Co-ordinated regulation of chitinases and β-1, 3-glucanases in bean leaves, Planta, 1988, **174**: 364—372.

[29] Mauch, F. , Mauch-Mani, B. , Boller, Tj. , Antifungal hydrolases in pea tissue. Ⅱ. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β-1, 3-glucanase, Plant Physiol. , 1988, **88**: 936—942.

[30] Metraux, J. P. , Streit, L. , Staub, Th. , A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase, Physiol. Mol. Plant Pathol. , 1988, **33**: 1—9.

[31] Hoj, P. B. , Hartman, D. , Morrice, N. A. , Doan, D. N. P. , Fincher, G. B. , Purification of (1, 3)-β-glucan endohydrylase isozyme Ⅱ from germinated barley and determination of its primary structure from a cDNA clone, Plant Mol. Biol. , 1989, **13**: 31—42.

[32] White, R. F. , Antoniw, J. F. , Virus-induced resistance responses in plants, Critical Rev. Plant Sci. , 1991, **9**: 443—455.

[33] Versa, P. , Hernandez-Yago, J. , "Pathogenesis-related" protein, Vascuolar and apoplastic localization in leaf tissue from tomato plants infected with citrus exocortis viroid: *in vitro* synthesis and processing, J. Gen. Virol. , 1989, **70**: 1933—1942.

[34] Carr, J. P. , Dixon, D. C. , Nikolau, B. J. , Voelkerding, K. V. , Klessing, D. F. , Synthesis and localization of pathogenesis-related proteins in tobacco, Mol. Cell Biol. , 1987, **7**: 1580—1583.

[35] Bol, J. F. , Van Kan, J. A. L. , Cornelissen, B. J. C. , Plant defence genes induced by virus infection. In molecular Biology of Plant-Pathogen Interations (Staskawicz, B. , Ahlquist, P. , Yoder, O. , eds.), New York: Liss, 1988, 247—254.

[36] Sommich, I. E. , Schmelzer, Z. , Kawalleck, P. , Hahlbrock, K. , Gene structure and *in situ* transcriplocalization of pathogenesis-related protein 1 in parsley, Mol. Gen. Genet. , 1988, **213**: 93—98.

[37] Cohen, Y. , Niderman, T. , Mosinger, E. , Fluhr, R. , β-Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*, Plant Physiol. , 1994, **104**: 59—66.

[38] Madamanchi, N. R. , Kuc, J. , Induced systemic resistance in plants, In The Fungal Spore and Disease Initiatioin in Plants and Animals (Cole, G. T. , Hoch, H. C. , eds.), New York: Plenum Press, 1991, 347—362.

[39] Chen Z. , Klessig, D. F. , Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease resistance response, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, **88**: 8179—8183.

[40] Yalpani, N. , Silverman, P. , Wilson, T. M. A. , Kleier, D. A. , Raskin, I. , Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco, The Plant Cell, 1991, **3**: 809—818.

[41] Malamy, J. , Carr, J. P. , Klessig, D. F. , Raskin, I. , Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection, Seince, 1990, **250**: 1002—1006.

[42] Lotan, T. , Ori, N. , Fluhr, R. , Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers, 2nd Int. Cogr. Plant Mol. Biol. Jerusalem, 1988.

[43] Ryan, C. A. , Oligosaccharide signalling in plants. Annu. Rev. Cell Biol. , 1987, **3**: 295—317.

[44] Ham, K. S. , Kauffmann, S. , Albersheim, P. , Darvill, A. G. , Host-pathogen interactions, XIX, A soybean pathogenesis-related protein with β-1, 3-glucanase activity release phytoalexin elicitor-active β-stable fragments from fungal walls, Mol. Plant-Microbe Interac. , 1991, **4**: 545—552.

[45] Friedrich, L. , Moyer, M. , Ward, E. , Ryals, J. , Pathogenesis-related protein 4 is structurally homologous to the carboxy-terminal domains of hevein, Win-1 and Win-2, Mol. Plant Plant-Microbe Mol. Gen. Genet, 1991, **230**: 113—119.

[46] Van Kan J. A. L. , Cronelissen, B. J. C. , Bol, J. E. , A virus inducible tobacco gene encoding a glycine-rich protein shares putative regulatory elements with the ribulose bisphosphate carboxylase small subunit gene, Mol. Plant-Microbe Interac. , 1988, **1**: 107—112.

[47] Linthorst, H. J. M., Meuwissen, R. L. J., Kauffmann, S., Bol, J. F., Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, and PR-S in tobacco has no effect on virus infection, The Plant Cell, 1989, **1**: 285—291.

[48] Ahl, P., Gianazzi, S., b-Proteins as a constitutive component in hightly (TMV) resistant interspecific hybrids of *Nicotiana glutinosa*×*Nicotiana debneyi*, Plant Sci. Lett., 1982, 173—181.

[49] 李怀方，植物抗病毒侵染机制的电生理学研究，博士论文，北京农业大学，1992。

[50] 张中义、冷怀玉、张志铭、曹若彬、张天宇，植物病原真菌学，成都：四川科学技术出版社，1988。

[51] Scholtens-Toma, I. M. J., Joosen, M. H. A. J., De Wit, P. J. G. M., Appearance of pathogen-related proteins in plant host, In The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals (Cole, G. T., Hoch, H. C., eds.), New York, London: Plenum Press, 1991, 247—266.

[52] Joosen, M. H. A. J., De Wit, P. J. G. M., The identification of several pathogenesis-related (PR) proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulvum*) as 1, 3-β-glucanases and chitinase, Plant Physiol., 1989, **89**: 945—951.

[53] Young, D. H., Pegg, G. F., The action of tomato and *Verticillium albo-atrum* glycosidases on the hyphal wall of *V. albo-atrum*, Physiol. Plant Pathol., 1982, **21**: 411—423.

[54] Fristensky, B., Horovitz, D., Hadwiger, L. A., cDNA sequences for pea disease resistance response genes, Plant Mol. Biol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Genet. Eng., 1988, **11**: 713—715.

[55] 董汉松，植物识别子与病原细胞识别子间的互作，植物生理学通讯，1991，**27**：391—396。

[56] Tornero, P., Rodrigo, I., Conejero, V., Vera, P., Nucleotide sequence of a cDNA encoding a pathogenesis-related protein, P1—P14, from tomato (*Lycopersicon esculentum*), Plant Physiol., 1993, **102**: 325.

[57] Uknes, S., Dincher, S., Friderich, L., Negrotto, D., Williams. S., Regulation of pathogenesis-related protein-la gene expression in tobacco, Plant Cell, 1993, **5**: 159—169.

[58] Sharma, Y. K., Hinojos, C. M., Mehdy, M. C., cDNA cloning, structure, and expression of a novel pathogenesis-related protein in bean, Mol. Plant-Microbe Interac., 1992, **5**: 89—95.

[59] Joosten, M. H. A. J., Cozijnsen, T. J., De Wit, P. J. G. M., Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an arivulence gene, Nature, 1994, **367**: 384—386.

[60] Ebel, J., Cosio, E. G., Feger, M., Frey, T., Kissel, U., Reinold, S., Glucan elicitor-binding proteins and signal transduction in the activation of plant defence, Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agric., 1993, **14**: 477—484.

[61] Payne, G., Middlesteadt, W., Desai, N., Williams, S., Dincher, S., Carnes, M., Ryals, J., Isolation and sequence of a genomic clone encoding the basic form of pathogenesis-related protein 1 from *Nicotiana tabacum*, Plant Mol. Biol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Genet. Eng., 1989, **12**: 595—596.

[62] Cornelissen, B. J. C., Horowitz, J., Van Kan, J. A. L., Goldberg, R. B., Bol, J. F. Structure of bobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group, Nucleic Acids Res., 1987, **15**: 6799—6811.

[63] Keller, B., Schmid, J., Lamb, C. J., Vascular expression of a bean cell wall glycine-rich protein-β-glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco, EMBO J., 1989, **8**: 1309—1314.

[64] De Looze, M., Alliotte, T., Gheysen, G., Genetello, C., Gielen, J., Primary structure of a hormonally regulated-glucanase of *Nicotiana plumgaginifolia*, Gene, 1989, **70**: 13—23.

[65] Hooft van Huijsduijnen, R. A. M., Kauffmann, S., Brederode, F. Th., Cornelissen, B. J. C., Legrand, M., Homology between chitinases that are induced by TMV infection of tobacco, Plant Mol. Biol., 1987, **9**: 411—420.

[66] Broglie, K. E., Biddle, P., Gressman, R., Broglie, R., Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a bean chitinase gene in transgenic tobacco, Plant Cell., 1989, **1**: 599—607.

[67] Payne, G., Middlesteadt, W., Williams, S., Dsai, N., Parks, T. D., Dincher, S., Carnes, M., Ryals, J., Isolation and nucleotide sequence of a novel cDNA clone encoding the major form of pathogenesis-related protein R, Plant Mol. Biol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Biochem. Genet. Eng., 1988, **11**: 223—224.

[68] Castresana, C., de Carvalho, F., Gheysen, G., Habets, M., Inze, D., Van Montagu, M., Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* β-1, 3-glucanase gene, The Plant Cell, 1990, **12**: 1131

MOLECULAR BIOLOGY FOR INDUCTION OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS

Dong Hansong, Wang Shaohua and Zheng Jifa

Pathogenesis-related (PR) proteins were discovered the early 1970s and have obtained great development in both concept and research extent. Before 1980s, PR proteins were defined in the concept of b proteins, on which most researches were mainly about isolation, chemical characterization and phenotypical correlation with plant disease resistance of the proteins. Expansion of the conception, from b proteins taken as acid, small molar weighty, and protease- and heavy ion-resistant proteins, is primarily contributed by finding basic and intercellular "b" proteins, and then, in 1981, by putting forward "pathogenesis-related protein" as a term which do not exclude the proteins occurred during plant-pathogen interactions and plant stress without defined or directed functioins for disease resistance. This concept expansion promotes interesting in researches on PR proteins in both range of elicitation and species of plant-pathogen (plant-microbe) interactions. Then in the middle 1980s, that some PR proteins were characterized as chitinase (Ch) and β-1, 3-glucanase (Glu) brings about significant progress for understanding pathological roles of the proteins and extensive explorations on PR proteins, at least including cloning and transgenic use of Ch and Glu genes from microbe, mainly bacteria, library construction of cDNA clones from the protein sequences, and, with these clones, analysis of molecular structure and expression regulation of PR genes. For functions of PR poteins in plant defence against pathogens, two evident alternations were thus resulted. First, they have been investigated as one of functional molecules in the responsive sequences of the plant defence. Secondly, they have been considered connecting together with plant development and plant-environment interactions. In the whole context of this paper, biological and biochemical properties and pathological function of PR proteins, and orgnization and expression regulation of PR genes are discussed, while in this English summary, only general and important respects, in our judge, of them are abstracted.

Biological and biochemical properties of PR proteins have been well understood, and many reviews can be available. What are interesting are the conserved sequences of the proteins and N- and C-terminal sequences of their precursors. The conservation indicates a common mechanism in evolution of this group, and maybe of other groups of inducible proteins. If this hypothesis is considered connecting with repeated and conserved nucleotide sequences in PR genes and genes for other inducible proteins, especially in the signal-responsive elements, people can expect to find a "common trigger" which can be

stimulated by artificial execution of the elicitors or exogenous signals to trigger resistance mechanisms of plnats to different diseases. The C-terminal sequences in PR protein precusors are suggested to contributed to stability of the proteins by glycosylation which occurs in a lot of PR proteins and accompanied with removal of signal peptieds near the N-terminal sequences. While, the signal peptides seems to determine pathways of the proteins to be transported, and contribute to special localization of PR proteins. These phenomena possibly implicate concordance of PR proteins in pathological functions with plant development, according to a assumption that acid PR proteins localized extracellularly are the first and basic ones intercellularly the second barriers to counter infection by pathogens.

When the elicitation of PR proteins is investigated, more significance can be found in the signal transmission initiated by the exogenous elicitors (exo-E) or the primary stimuli (Pr-S) than in the exo-E and Pr-S themselves. A common procedure of the signal transmission is as follows: primary signals (exo-E or Pr-s) →secondary (or endogenous) signals→third signals (?)→target sequences (responsive elements) of genes→transcription activation→functional elements for plant defence against pathogens. PR proteins are only one candidate of the functional defence elements which at least include lignification, phytoalexin, hydroxyproline-rich proteins and enzymes related to plant defence. Therefore, pathological roles of PR proteins should be understood in the orderliness and timeliness (for concept see, Dong et al., Part 1) of plant defence events. Of course, how the signal transmission is accurately accomplished is still an interesting subject remained to be known. From this standpoint, pathological functions of PR proteins are suggested to be: ①attacking or inhibiting pathogens; ②degrading given cell wall component of plants or/and pathogens to release the secondary (endogenous) elicitors; ③deactivating toxins as pthogenicity factors of pathogens; ④binding coat proteins of viruses, and ⑤ acting as the secondary signals or as receptor of the secondary signals such as salicylic acid. What is greatly worth doing further researches is to provide evidences for each of suggested functions, because defined functions have been known only for some of PR-2 and PR-3 groups, with representatives of β-1,3-glucanases and chitinases respectively.

According to the general knowledge, characteristics of molecule orgnization and expression regulation of PR genes are summarized as eight aspects as follows. ①All of PR proteins are multigene encoded. Genes for a PR group composes of a individual gene family, and thus there are the names PR-1 gene family to PR-5 gene family. High conservation and homology of DNA sequences exist between the genes (gene members) of the same family. ②Genes of different families can receive the same signals or stimuli. They express either concordantly or suppressively each other when response to a same signal. ③A PR gene family usually includes different gene members, each of which is responsible for receiving one or more special signals and expresses either concordantly or suppressively when responses to more than one signals which are applied simultaneously.

Similarly, different members may or may not be at the same time activated by a same signal. ④A gene member of a PR gene family has ordered division in the sequences with special functions, and can include promoter, target sequences (TS) and structural genes. The critical component of TS is responsive element which recognizes the signal, sometimes accompanied with a enhancer sequence. ⑤It is found that the TS recognize the signal with strict selectivity, even to isotypes of a same elicitor compound in some cases. ⑥ At least part of the gene members contains a number of direct and inverted repeats in their up-stream regions. The repeated sequences appear to regulate the TS expression. Also, such up-stream can have one or more introns, which show function of conditioning whether the gene receives a given signal or not, i. e. taking part in regulation of the TS. On the other hand, some introns in a gene can act as exons in the others. ⑦All of genes for PR proteins, as the same as major of the other functional elements in plant defence against pathogens, are activated at transcription level, i. e. no rearrangement of nucleotide codons, or new gene, is induced to form by the elicitation treatments. ⑧As in the other functional elements, expression of PR genes are also regulated by plant development and regulated or affected by the endogenous hormones and/or elicitors, such as ethylene, salicylate, H_2O_2 and so forth, some of which act as the putatively sceondary signals.

Constitutive expression of PR genes in transgenic plants and other types of regenerants has implied more for understanding mechanisms of the expression regulation than for reaching the practical purposes of improving plant resistance to diseases by the plant transduction with PR genes as targets. In transgenic plants, PR genes shows one or all of the following expressions: ①it is impossible that PR proteins protect plant hosts from viruses at least by the priciple of cross-protection, i. e. disturbing the process of uncoating of the challenging viruses; ②introduction of PR genes can give certain effects on expression of the native chromosome genes, being enhancing effects in the most cases; ③ introduction of PR genes can give certain effects on expression of the other interesting (alien) genes simultaneously involved in the same chmeric construct unit, for example, 35S+Gus+PR+CP, being enhancing effects in the most eases, and ④ the transgenic expressions confirm that PR genes are also regulated by plant development at a tissue or organ specificity.

It is noticeable that constitutive expressions of PR proteins in regenerants rather than those from trasgenic methods can be much reached at the practical purposes. Good examples are progenies from a hybrid of *Nicotiana glutinosa* × *N. debneyi*, and regenerated tobacco plants and their progenies from somatic variation procedures in which the original plants have been induced by viruses in advance for eliciting resistance to brown spot, black shank, wild fire and black lowering (a native disease cauced by *Collectotrihum capsici* Syd(Bulter)f. *nicotianae* Zhang et Jiang in some areas of China).

细胞壁木质化作用的生物化学和分子生物学

刘爱新　董汉松

一、前　　言

Behr(1949)和EL-Din-Fouad(1956)分别在黄瓜疮痂病斑和黄瓜抗病品种的死细胞中发现了具有木质素活性的物质，但不能确定这种木质素活性物质就是木质素。Hijwegen是最早确定诱导木质化可以成为抗病机制的人之一[1]。他发现抗黄瓜疮痂病的下胚轴皮层细胞接种5天后，具有木质素的活性，而在抗病的角质层、感病的和健康的下胚轴中则没有。因此，Hijwegen认为，除木栓形成和细胞死亡之外，木质化作用可能是另一种与抗病有关的反应。

近几年来，诱导木质化作为抗病防卫反应因子的报道已有很多[1-4]，包括许多真菌病害、病毒病和某些细菌、线虫病害。诱导木质化是在病原物侵入前或侵入过程中发生的，不仅出现于角质层细胞，而且也出现在植物组织器官的内层细胞中。诱导的因子有亲和性的、非亲和性的活体营养寄生物，也有死体营养的病原物及非病原物。与正常木质化相比，参与合成的酶基本相同，主要有苯丙氨酸氨基裂解酶(PAL)、过氧化物酶(POD)等；不同的是诱导的木质素含有较多的松柏醇成分，具有愈创木基木质素的性质。

诱导木质化作为一种抗病防卫反应，与寄主其他抗病反应有一定的协同性。这种协同作用是由基因按层次启动控制的。Vance[1]认为，一个基因可调节不止一种抗病机制，并以马铃薯中的抗性基因R和大麦中的Ml-a基因对此作了解释，认为它们分别与几种有效的抗病机制有关。木质素诱导合成中所涉及的PAL及POD，同时对类黄酮类植物保卫素[5,6]、酚类化合物[7]及富羟糖蛋白(HRGP)[8]的诱导合成都有密切关系；并且这几种抗病反应在代谢途径上都有着相似的中间产物，因而诱导的木质化作用与其他抗病防卫反应有本质的联系，它们可以分别在不同的时间顺序上发挥其抗病作用。

二、结构和生物合成

1. 结构

木质素是由多个木质素前体物在过氧化物酶(POD)作用下聚合而成的生物大分子(图1)，分子量约800—1200。根据前体物的不同，木质素可被分为3类[9]：主要由松柏醇聚合而成的木质素是大多数裸子植物，包括松、云杉和冷杉等的主要结构，称为愈创木基木质素；被子植物木质素多由松柏醇和芥子醇两种前体物聚合而成；禾本科植物木质素则是由芥子醇和P-香豆醇聚合形成。3种木质素前体的结构见图2，它们主要区别是苯环上的甲氧基的不同，芥子醇在3位和5位带有两个甲氧基，松柏醇只在3位上含一个甲氧基，而P-香豆醇苯环上没有甲氧基结构。前体物的不同，使得各类木质素在性质上出现差异。

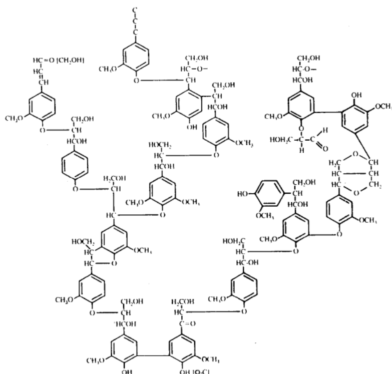


图 1 软木型木质素的组成模式[9]

Fig. 1 A model for a typical softwood lignin[9]

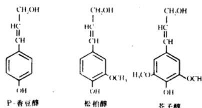


图 2 三种木质素前体物[9]

Fig. 2 Precursor monomers of lignin[9]

正常木质化的木细胞内，木质素首先在各细胞联接处的角隅出现，然后扩展，进入初生壁、次生壁和细胞的中胶层。Northcote[9]认为，疏水的木质素进入细胞壁内，与纤维素、半纤维素相互交叉形成网状结构，包围微纤丝和壁多糖形成细胞壁多糖的外壳。这一作用

的结果,一方面,加厚细胞壁,增加细胞壁的抗张强度;另一方面,木质素外壳作为一种机械屏障,使壁多糖不能接触多糖酶,从而保护细胞壁免受病原物产生的酶的降解。木质素与多糖之间主要通过共价键结合,另外,木质素单体如二阿魏酸可用它的两个羰基与细胞壁的半纤维素通过酯化作用形成酯键,同时在纤维素和半纤维素之间还有氢键形成。所有这些化学键的存在,使细胞壁增强了韧度和抗张强度。

2. 生物合成

木质素的生物合成是一个较为复杂的过程,不只由木质素单体氧化聚合而成,木质素内还含有缩合的丹宁、黑色素及其他类似的聚合物,这些物质同样参与木质素的性质;而且,随组织、器官及其发育程度不同,木质素成分都有差异。图3所示为与莽草酸代谢有关的生物合成途径。通常从碳水化合物形成莽草酸开始,到各前体物聚合成大分子。这一过程主要包括以下几步:苯丙氨酸经脱氨基形成肉桂酸,肉桂酸羟基化形成P-香豆酸(P-香豆酸还可通过酪氨酸由TAL催化形成,这主要在木本植物内),P-香豆酸进一步羟基化形成咖啡酸,咖啡酸在3位羟基上发生甲基化转化为阿魏酸,而阿魏酸再羟基化形成芥子酸。所有这些酸类物质以类似脂肪酸的形成方式,分别形成各自的酸酯,进而转变为醛,最后转化成对应于P-香豆酸、阿魏酸、芥子酸和肉桂酸的木质素前体物香豆醇、松柏醇、芥子醇和桂皮醇,这些前体物经氧化聚合形成木质素。至少有9种酶参与上述过程(表1)。

表1　参与木质素合成的酶

Table 1　Enzymes involved in lignin biosynthesis

催化酶	有关反应
苯丙氨酸氨基裂解酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL)	苯丙氨酸→肉桂酸
酪氨酸氨基裂解酶 (tyrosine ammonia lyase, TAL)	L-酪氨酸→P-香豆酸
肉桂酸-4-羟基化酶 (cinnamic acid-4-hydroxylase)	肉桂酸→P-香豆酸
P-香豆酸羟化酶 (P-coumaric hydroxylase)	P-香豆酸→咖啡酸
o-甲基转移酶 (o-methyltransferase)	咖啡酸→阿魏酸 芥子酸→阿魏酸
肉桂酸-CoA-连接酶 (cinnamate acid-CoA-ligase)	阿魏酸→阿魏酸-CoA-酯 肉桂酸→芥子酸-CoA-酯
肉桂酸-CoA-氧化还原酶 (cinnamoyl-CoA-oxidoreductase)	肉桂酸→CoA-酯→桂皮醛 阿魏酸-CoA-酯→松柏醛 芥子酸-CoA-酯→芥子醛
桂皮醇脱氢酶 (cinnamyl alcohol dehydrogenase)	桂皮醛→桂皮醇 松柏醛→松柏醇 芥子醛→芥子醇
过氧化酶 (peroxidase, POD)	醇前体物→木质素

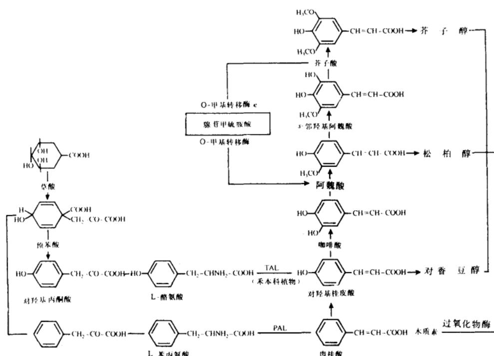


图3 从莽草酸合成木质素的途径[9]

Fig. 3 Biosynthetic pathway of lignin from shikimic acid[9]

三、诱导合成和病理功能

1. 诱导合成

木质化作用作为一种抗病防卫反应，可被病原物的侵染所诱导；病原物包括大多数真菌（亲和、非亲和及非病原真菌）、病毒及某些细菌和线虫。木质素的诱导合成常出现在侵染点周围，并伴有多种酶活性的增加。例如，接种 *Septoria tritici* 的小麦叶中，当接种点木质素沉积时，伴有 PAL、TAL 及 O-甲基转移酶活性增加；用 TMV 接种豌豆叶片，随病斑周围木质素合成，PAL 和 POD 活性增强；胡萝卜接种 *Alternaria* 后，PAL 和阴性过氧化酶同工酶随接种点木质化的出现而活性增高。这些结果表明，木质素被诱导合成时，相关的酶活性提高，这些有关的酶活性的增高可以反映与木质素诱导合成有关的多酶复合体的激活。

(1) PAL 和 POD：PAL 和 POD 是诱导合成木质素最常见的酶。PAL 催化的苯丙氨酸向肉桂酸的转变是木质素诱导合成的起点。该酶也是植物抗病反应中一种很重要的酶，它不仅参与木质素的合成，而且与酚类代谢和植物保卫素的合成都有密切的关系。PAL

的活性水平可受多种因素诱导，包括光[10]、化学物质如激动素(N^6-呋喃甲基腺嘌呤)[11]、机械损伤[1]和病原物侵染等外界因子，同时可被激素等内源物质所调控。杨秀屏等[12]用叶锈菌侵染的小麦叶片为材料进行的研究表明，PAL 活性的增加与木质素含量的变化呈相似趋势；在对芦苇(reed canarygrass)研究中由于使用环己酰亚胺抑制了 PAL 活性，木质素合成同时也受到阻碍，表明 PAL 与木质素生物合成的关系。

木质素诱导合成的另一种重要酶为过氧化酶(POD)。这是一种壁结合酶[1,9]，在木质素合成中同样具有重要作用。首先，它可催化木质素前体经氧化聚合作用形成木质素，包括两个步骤：①催化 NADH→NAD 的氧化反应，以提供 H_2O_2；②在 H_2O_2 和木质素前体存在的条件下进一步催化松柏醇等前体物聚合成木质素；同时，POD 还可催化木质素与壁多糖及壁蛋白(包括 HRGP)以共价键结合，形成一定构架，以便木质素进一步沉积。

(2) 木质素前体物来源：有关木质素前体物来源的研究报道较少。据 Clowes 和 Juniper[9]推测，木质素前体物可以从分生组织的细胞中作向心移动而到达木质素合成位点。他们认为，很可能类丙烯前体物在活细胞内产生，然后扩散到聚合作用点，在此释放不易溶解的自由醇。而诱导木质素合成是定点反应，它的前体物来源尚缺乏直接证据，引述的证据认为"大量的木质素前体物可以在木质素作用的发生点形成"。但这些前体物是由酚类物质从头合成，还是由预形成的结构转化而来，仍是一个待解决的问题。

(3) 真菌诱导的木质素合成：Asada 和 Matsumoto 在胡萝卜的研究中发现，用 *Alternaria japonica* 接种萝卜根部，根部木质素含量明显高于对照，并通过 UV、IR 光谱和化学降解确认为木质素后，进一步对其性质进行测试，表明诱导合成的木质素与正常合成的不同，诱导型木质素含较少的羰基，具有裸子植物中愈创木基木质素性质，其前体物主要是松柏醇。对这一现象的解释是：接种后 PAL 和过氧化酶(POD)是从头合成的，并且碱性和中性过氧化酶同工酶活性增加，这些过氧化酶同工酶可催化 P-香豆醇和松柏醇脱氢聚合，但不能催化芥子醇，因此所形成的木质素具有愈创木基性质。对禾本科作物小麦及葫芦科中黄瓜、香瓜等的研究中，发现诱导合成的木质素也有这一特点。

诱导木质化不止参与局部抗性，也与系统抗性有关[1,13]。Jouze 等用 *Colletotrichum lagenarium* 的毒性菌株接种香瓜子叶，诱导了对挑战接种菌的系统抗性。与此类似，用 *Clagenarium* 接种黄瓜下部叶，和用 *Cladosporium cucumerimum* 及 *C. lagenarium* 分别接种葫芦，都诱导了对后来挑战接种菌的系统抗性。Kuc 对此作了如下解释：预接种所产生的系统保护作用与挑战接种的侵入点周围细胞的迅速木质化有关。在诱导的系统抗病性中，潜在的诱导木质化从侵入点处转移，其潜在性只有挑战接种后在接种点才能表达，而且在未接种点不发生木质化。并认为潜在的系统木质化诱导与过氧化酶系统性地增加有关[18]。

诱导木质化的另一个特点是，诱导的木质化作用与寄主的抗病性、感病性及病原物的致病性有关。马铃薯含 R_1 抗性基因的品种与含 r_1 感病基因的品种的块茎中几乎含有等量的木质素，用 *Phytophthora infestans* 的小种 4 接种后，含 R_1 基因的抗病品种中木质素含量明显高于含 r_1 的感病品种，而且前者的接种点周围细胞壁明显加厚。小麦叶片用非病原物 *Botrytis cinerea* 和病原物 *Septoria tritici* 分别接种后，感病的组织中木质化形成的速度慢而且程度弱，病原物可扩散到木质化区的外侧；而非病原物则被限定在木质化区之内不能扩展。

（4）病毒诱导的木质素合成：许多情况下（并非所有情况），病毒粒体可被限定在坏死斑内不能扩散，这种现象除与寄主细胞死亡、胞间连丝（plasmodesmata）的损伤有关外，与胼胝质和木质素的形成沉积也有一定关系[14]。Kimmis 等用 TMV 接种豌豆叶片后，在接种点周围出现木质素的沉积，并认为这种木质化区限定了病毒粒体的扩展。诱导木质化作用限定病毒粒体扩展的现象在接种 TMV 和 SBMV（southern bean mosaic virus）后也有发生。在其他病毒-寄主体系中，如苜蓿花叶病毒（alfalfa mosaic virus）接种利马豆（Pinto bean），花椰菜花叶病毒（CaMV）接种大白菜，接种点周围木质化区都可限定病毒的扩展，并发现有 PAL 和 POD 活性的提高，说明木质素是诱导合成的。但 Appiano 用番茄丛矮病毒 TBAV 接种千日红后，发现诱导木质化区的外围细胞内仍有病毒粒体的存在。说明木质化作用对 TBSV 来说并不是有效的屏障。

（5）细菌和线虫诱导的木质化：通常认为，诱导木质化是丝状真菌的特征，酵母菌和细菌不具有这种能力。但 Guo[10]研究发现，含 X_a-10 抗黄单胞菌基因的水稻品种接种无毒性的黄单胞菌后，光照射 8 小时，于两天后测到过敏反应斑中阳性过氧化酶和类木质素物质，并发现这种物质与 HR 组织中的细菌繁殖的降低有关。

线虫 *Meloidogyne incogite* 侵染番茄时，观察到有木质素活性的物质沉积和过氧化酶活性的增高。并且发现抗病品种中阴性过氧化酶的活性是感病品种的两倍，而对照中则没有测到。这种过氧化酶与木质素的诱导合成有关。

2. 木质化作用的病理功能

Ride 对木质化作用可能的抗病防卫机制从 5 个方面作了总结。①木质素使细胞壁增强了抗真菌机械侵入的能力，壁的木质化作用一方面使细胞壁加厚，另一方面增加了细胞壁的韧度。②细胞壁的木质化可抵抗真菌酶的降解。Ride 在对小麦研究中发现，接种区周围的健康组织可以抵抗真菌细胞壁降解酶混合物的降解。进一步对这一区域染色，表明该区具有木质素活性。Friend 对这一现象作了如下解释：木质素与细胞壁多糖的酯化作用改变了壁多糖作为底物的适应能力；另外，木质素在细胞壁上的沉积所形成的壁多糖的外壳，减少了细胞壁降解酶与多糖接触的机会。③壁的木质化作用限制真菌酶和真菌毒素向寄主的扩散，同时限制病菌从寄主体内吸取水分及营养物质，饥饿真菌使其不能生长。④木质素生物合成过程中产生的低分子量的酚类前体物和自由基，可降低真菌膜、酶、毒素生物活性。许多酚类物质都有真菌毒性。⑤可以钝化真菌的生长点，限制真菌的生长。真菌的菌丝可吸收木质素，而真菌壁上含有几丁质、纤维素及多糖，因而可以作为木质素沉积的底物，使菌丝顶端木质化而不能生长。总之，无论木质化作用以何种方式作为抗病机制，其抗病防卫反应都是显而易见的。在对胡萝卜组织细胞学研究中表明，未经诱导处理的薄壁组织细胞中无木质素存在，病原物可侵染到每个薄壁细胞内，而在诱导处理的组织中，所有木质化的细胞内都没有发现病原物。对马铃薯的研究中也有类似的报道。因此，诱导木质化总会以一种或几种机制抵抗病原物。

四、木质化与其他抗病防卫反应

1. 木质素与晕圈

Aist 将晕圈定义为“寄主细胞壁围绕侵染点而改变的区域”[15]，常在侵入丝被限制前形成，因而寄主细胞壁的改变可以阻碍侵入丝的生长。对晕圈中的成分测试，发现大麦白粉病菌侵染大麦后所形成的晕圈中有 Si、Ca^{2+}、蛋白质（包括水解酶）和酚类物质，但并无木质素。而 Murray 对冬小麦接种 *Pseudocercosporela herpotrichoids* 后，在形成的晕圈中则发现了木质素的存在，表明木质素并非晕圈中所必须的。

2. 木质素与乳突的形成

乳突即真菌侵染点下由寄主原生质在细胞膜和细胞壁之间沉积而形成的隆起，其病理功能就是阻止病原物的侵染[16]。许多试验表明，乳突是一种细胞学的抗病机制[1,15,16,17]，其中含有水解酶、酚类物质、蛋白质、多糖和 Ca^{2+}、P 等化学元素，及大量的木质素。Vance 等对乳突的组织化学的研究表明，木质素主要构成乳突的中心和外侧的壁，并认为这种木质素与正常维管束细胞内的木质素在组织化学上没有区别，都包含了丁香素和桂皮酰类物质。同时他们对 PAL 及过氧化酶的活性进行了测试，两种酶的活性都明显增加，环己酰亚胺处理后，则 PAL 的活性受阻，乳突中木质素的合成同时受到抑制，表明乳突中的木质素是诱导合成的。

小麦幼苗受全蚀病菌侵染后，形成一种木质管（lignitube），并同时观察到小麦幼苗的内部组织如皮层、中柱鞘及髓中有木质素活性，但中柱内仍发现了全蚀病菌的菌丝，说明木质化的乳突、木质管及中柱鞘细胞壁的木质化都未能阻止病原物的扩展。在由 *Fusarium culmorum* 侵染小麦，及 *Verticillium albo-atrum* 侵染蛇麻（*Humulus*）时，都发现有木质化乳突及木质管的形成，并发现两种情况下寄主中的木质管都未能完全阻止病原物的侵入。

3. 乙烯、富羟糖蛋白与木质化

乙烯在抗病性中的作用是有争议的。某些情况下可诱导抗病性，另一些情况下则诱导感病性。用乙烯利处理植物组织至少可强化 4 种与木质素生物合成有关的酶的活性：PAL、肉桂酸-4-羟基化酶、肉桂酸-CoA-连接酶及壁结合的过氧化酶，并认为乙烯诱导的木质素可作为抗纤维素酶的机制。

乙烯诱导的木质化作用可由细胞壁上的富羟糖蛋白所调节。乙烯的处理能诱导 HRGP 的积累。HRGP 的积累一方面可增加细胞壁的强度，提高抗病性；另一方面，又可作为木质素沉积的底物，促进木质化作用。HRGP 还可作受体参与病原物的识别，激活木质素生物合成系统。

五、木质化作用的特异性

1. 木质化与识别

植物与病原物的识别是通过来自病原物的供体（ligand）与寄主植物的受体

(receptor)特异结合来完成的[18]。病原物中可作为激发子的物质除真菌细胞壁的成分(如细胞壁多糖及蛋白质等)外,其他物质如毒素也可作为激发子。激发子或受体应该具备的特点是:有一个反应中心;与对方有强的亲和力;有固定的结构和构型。反应中心或构型的微小变化将改变其特异性。寄主来源的低分子量的木质素前体物或中间产物具有上述性质,因而可作为诱导木质素的激发子。木质素前体物如松柏醇,可与壁上的HRGP结合,阿魏酸可与胞壁多糖结合,而真菌壁的几丁质可作为木质素沉积的底物,因此,木质素前体可与真菌壁和膜反应激活识别系统,或通过其他化合物阻止激活。而木质素大分子由于不具备上述特点而不能参与识别。

木质素前体物作为激发子有一定特异性,即并非所有真菌病原物-寄主体系都可通过识别而诱导木质化。木质素前体物存在于大多数病原物-植物的互作体系中,其参与识别作用是有限的,只能作为特异性的激发子。在一定的植物中,可能与含几丁质的真菌(如子囊菌、担子菌)较容易发生作用,而与不含几丁质的真菌作用较困难。在小麦中,只有丝状真菌具有诱导木质化的活性,酵母菌和细菌不具备这种激发子。因此认为诱导木质化作用的激发子存在于与分类单位有关的真菌中,而小麦中可能只有一个受体与这一类的真菌发生识别。研究表明,小麦中诱导木质化的识别系统不是单一的elicitor-receptor的识别,例如,子囊菌和担子菌中通常含有的几丁质,可激发小麦的木质化作用,而*Botrytis cinarea*的粘液中的一种化合物也可激发小麦中的木质化作用。这一现象表明,小麦中可能含一个诱导木质化的受体,这一受体可被两个不同的激发子中的任一个所激活;或者,小麦中含有两个受体,而每一个受体都可激活木质化作用。

2. 木质化作用与基因调控

研究认为,诱导木质化作用的特异性由病原物中诱导木质化的潜在基因和植物中对此发生反应的基因所控制。对茄科*Phytophthora*观察表明,单基因遗传的过敏反应(HR)与抗病品种中强烈的木质化作用有严格的相关性,说明木质化的特异性由单个基因控制。然而,Henderson等提出,多基因遗传更能控制诱导木质化的水平。他认为,可被非亲和小种诱导木质化的品种,也可被亲和小种作某种程度的诱导,而且不同的感病品种被同一病原小种诱导后,木质化作用在同一水平上变化,因此料想种特异性或"家族"特异性水平上的抗性,与生物型水平上的抗性相反,主要由多基因控制。

六、结　　语

诱导木质化作为一种抗病机制,在抗病反应中可起到一定的作用,特别对限制通过细胞壁侵染的病原物和某些病毒粒体扩展是有效的。但诱导的木质化在某个病原物-寄主体系中的作用是不固定的,与品种的抗(感)病性、病原物与植物的亲和性及环境条件有关。这些因素可影响木质化出现的时间和发生程度。木质素并不总是有效的抗侵入和扩展的屏障,在某些例子中,诱导的木质化区仍可发现病原物的扩展和侵入。对某些病原物如何克服木质化区是机械损伤或是酶降解以及病原物产生的可能的降解酶的情况,仍缺乏研究和证据。同时,诱导的木质素在组成上与正常木质素的差异是否与抗病反应有关,也是待研究的问题。

参 考 文 献

[1] Vance, C. P., Kirk, T, K., Sherwood, Ri. T., Lignification as a mechanism of disease resistance. Annu. Rev. Phytopathol., 1980, **18**: 259-288.

[2] Campbell, M. M., Ellis, B. E., Fungal elicitor-mediated response in pine cell cultures. Plant Physiol., 1992, **98**: 62-70.

[3] Nagarathna, K. C., Shetty, S. A., Shetty, H. S., Phenylalanine ammonialyase activity in pearl millet seedlings and its relation to downy mildew disease resistance. J. Exp. Bot., 1993, **44**: 1291-1296.

[4] Biles, C. L., Wall, M. M., Wough, M., Palmer, H., Relationship of *Phytophthora* fruit rot to fruit maturation and cutical thickness of New Mexican-type peppers. Phytopathol., 1993, **83**: 607-611.

[5] Coleman, M. J., Mainzer, J., Dickerson, A. G., Characterization of a fungal glycoprotein that elicits a defence response in French bean. Physiol. Mol. Plant Pathol., 1992, **40**: 333-351.

[6] Jakobek, J. L., Smith, J. A., Lindgren, P. B., Suppression of bean defence responses by *Pseudomonas syringae*. Plant Cell, 1993, **5**: 57-63.

[7] De-Sa, M. M., Subramanian, R., Williams, F. E., Douglas. C. J., Rapid activation of phenylpropanoid metabolism in elicitor treated hybrid poplar suspension cultured cells. Plant Physiol., 1992, **98**: 728-737.

[8] Oku, H., Gene expression in susceptibility and resistance of fungal plant diseases, Molecular singnals in plant-microbe communication. (Verma, D. P. S., ed.) Boca Raton: CRC Press, 1992, 49-63.

[9] Goodman, R. N., Kirly, Z., Wood, K. R., The Biochemistry and Physiology of Plant Disease, Columbia: Univ. of Missouri Press, 1986, 105-149.

[10] Guo, A., Reimers, P. J., Leach, J. E., Effect of light on incompatible interactions between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice, Physiol. Mol. Plant Pathal., 1993, **42**: 413-425.

[11] Funk, C., Brodelius, P. E., Phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia* Andr. Plant Physiol., 1992, **99**: 256-262.

[12] 杨秀屏、韩公社、王冬梅、刘娟、王智析，叶锈菌侵染过程中小麦叶片 PAL 活性和木质素含量的变化。植物抗性生理研究(赵可夫主编)，济南：山东科学技术出版社，1992，208-212。

[13] Smart, M. G., The plant cell wall as a barrier to fungal invasion. In the Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals (Cole, G. T., Hoch, H. C., eds.) New York: Plenum Press, 1991, 47-66.

[14] See Ref. 9, 347-407.

[15] Aist, J. R., Bushnell, W. R., Invasion of plant by powdery mildey fungi and cellular mechanisms of resistance, See Ref. 13, 321-345.

[16] Aist, J. R., Gold, R. E., Prevention of fungal ingress: The role of papillae and calcium. In Molecular Determinants of Plant Diseases (Nishimura, S., Vance, C. P., Doke, N., eds.). Tokyo: Jap. Sci. Soc. Press, 1987, 47-58.

[17] Murray, T. D, Huazhi, Ye., Papilla formation and hypersensitivity at penetration sites and resistance to *Pseudocercosporella herpotrichoides* in winter wheat. Phytopathol., 1986, **76**: 737-744.

[18] 董汉松，寄主植物与病原微生物间的相互识别，农业生物技术进展与展望——国家 863 计划生物技术领域第一主题学术研讨会论文选编'92(贾士荣主编)，合肥：中国科学技术大学出版社，1993，65-79。

LIGNIFICATION AND RELATED STRUCTURAL FACTORS FOR THE PLANT DEFENCE

Liu Aixin and Dong Hansong

Lignins can be biosynthesized by most vascular plants. They are usually classified into three major groups according to the precursors that compose the lignin. The first one is Gymnospermous wood lignin, which is formed mainly by coniferyl alcohol, termed guaiacyl lignin. The second group is Angiospermous lignin, being mixtures of coniferyl and sinapyl alcohols. Grass lignins belong to the third group and are also compexes of sinapyl and P-coumaryl alcohols.

The synthesis of lignins can be induced by different factors, such as infection of fungi, viruses, bacteria and nematodes, except the synthesis in the normal wood Cells. As a feature of induced-lignins, they differ from normally synthesized lignins in lower methoxyl contents which reflect the guaiacyl nature. This feature was thought to be correlated with the resistance mechanisms of the induced lignins.

In the induction of lignification, specificity of plant-pathogen interations have been shown in two aspects. First, a lignin can be induced only by one or more special pathogen-generating elicitors which must be the precursor of the lignin in most cases. When such specific elicitors of lignin precursors take roles, the plant is needed to provide specific receptors, which is a case of the elicitor-receptor model (see Dong et al., the topic of "The elicitors"). Secondly, such an elicitor-receptor recognition is closely correlated with specific activation of certain genes encoding enzymes for lignin biosynthesis, indicated by the phenomenon that a pathogen-generating elicitor can only induce transcription of special genes encoding special enzymes in a special plant-pathogen interaction other than the interactions with the pathogens which are not the sources of the elicitor.

Induced lignification always occurs at the site of inoculation before or during the penetration of the pathogens. The pathway of lignin biosynthesis was suggested to be related with shikimic acid pathway. It begins with the deaminition of phenylalanine to cinnamic acid and ends with the polymerization of cinnamyl alcohols. Many enzymes such as phenylalanine ammonialyase(PAL) and peroxidase(POD)etc., are involved in the synthesis of induced ligni fication. When plants are inoculated with pathogens (compatible or incompatible), there is always increasing activity of some related enzymes including PAL and POD at the site of penetration. The curve of increasing activity of PAL was correlated with that of lignin in wheat leaves inoculated with *Puccinia recondita* f. sp, *tritici*. This indicates that increase of PAL was related with induced lignification. PAL is

the key enzyme of phenol metabolism and catalyzes the reaction of phenylalanine to cinnamic acid. Many factors such as light,hormones and various kinds of stresses can affect its activity. PAL was also suggested to be related with other metabolisms, e. g. phytoalexin biosynthesis and accumulation of phenylpropanoid. Then lignification as a mechanism of induced disease resistance may be linked to other resistant systems through common precursors and may proceed from the same recognition event which triggers the other mechanisms. These systems may work together in a complementary manner. As suggested by Ride that cell wall modification, including lignification, may retard fungal progress so that phytoalexins have time to accumulate in effective concentrations. Conversly, phytoalexins may retard fungal growth until wall modifications become effective.

The role of induced lignification itself is also suggested to be a barrier to the spread of virus particales or to limite the primary infection and growth of the fungal pathogen. The mechanisms of lignin as a barrier are assumpted to be thickening plant cell walls and thus fortifying them. When lignin deposites at plant cell wall the radicals of lignin may esterify with cell wall polysaccharide. This could not only alter the suitability of the polysaccharides as substrates of fungal enzymes, but also physically shield the wall saccharides from fungal saccharidases. So lignification of plant cell wall at the penetration site may render it resistant to dissolution by fungal enzymes. The lignin may also restrict diffusion of enzymes and toxins from the fungus to the host, and of water and nutrients from host to the fungi. Many precursors and radicals of lignin are phenylpropanoids, and they may also be toxic to pathogens. Conclusively, lignification of plant cell walls at the invaded sites would impede fungal growth to some extent through one or more of the mechanisms mentioned above.

富羟糖蛋白(HRGP)及其抗病防卫功能

梁元存　董汉松　刘爱新　刘延荣

一、前　　言

60年代初,Lamport 和 Dougall 两个实验室同时发现,植物的细胞壁上存在一种结构蛋白,富含羟脯氨酸的糖蛋白(hydroxyproline-rich glycoprotein,简称富羟糖蛋白,HRGP)。这是一类具有特殊结构、分子组成及特定功能的糖-蛋白质复合体,构成了植物细胞壁蛋白质的主要组成部分。HRGP 除了在植物生长发育中担负有组织或器官特异化的功能外,还可以对病原物侵染、细胞损伤等发生反应而增加它们在细胞壁中的积累量;在不少病害体系中,HRGP 的诱导积累与植物抗病性增强密切相关,在植物-病原物互作的亲和性分化中显示出差别;某些 HRGP 还是参与豆科植物-根瘤菌共生关系形成和发展的因子;另外,HRGP 作为参与植物抗病防卫反应的一种因子,在诱导发生的环节或抗病功能的协同作用上,与植物抗病防卫的其他反应也有密切关系[1,2]。

由于 HRGP 结构和功能的这种特殊性和重要性,近年来,尤其是 1985 年以后对它们的研究十分活跃,按植物种类,不仅涉及番茄、马铃薯、烟草、甜瓜、菜豆等双子叶植物(HRGP 的诱导积累主要发现在双子叶植物中),还涉及小麦、燕麦等单子叶植物;从植物-病原物互作来看,涉及倍受分子植物病理学研究所关注的典型病害体系,并代表了不同的病原物类型。本文在讨论 HRGP 生物化学特性的基础上,重点评述它们与植物-病原物互作的关系和在植物抗病防卫反应中的作用;讨论 HRGP 在植物生长发育中的功能;介绍它们参与这些作用的分子遗传和基因调控方面的研究进展。

二、生物学和生物化学特性

1. 分子结构和化学组成

作为存在于植物细胞壁上的一类糖-蛋白质复合体的通称,HRGP 是一种线性分子,碳水化合物主要是阿拉伯糖和半乳糖;羟脯氨酸来自转羟基化脯氨酸肽苷残余物。蛋白质与碳水化合物之间以 O-糖苷键联接。这种 O-糖苷键可以发生在糖与羟脯氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸等氨基酸之间[3];除作为肽的主要成分的羟脯氨酸和脯氨酸外、不同的 HRGP 分子中还含有各种不同的氨基酸,如酪氨酸、赖氨酸、丝氨酸等[4](表 1)。

在 HRGP 的线性主体结构中,碳水化合物和氨基酸成分被认为赋予 HRGP 不同的结构上和生物学上的作用[3]。碳水化合物构成 HRGP 的框架,使其分子成直线状态,它的糖残基被表明与细胞壁大分子联结有关[1]。蛋白质中的氨基酸多为碱性,所以 HRGP 的等电点一般为 10－12,使分子带负电荷,可以结合阴性粒子;多肽链看来可以粘联某些病原真菌[1]。这种结构框架和电荷特性,是 HRGP 具有植物抗病防卫反应功能的基础。

表 1 烟草愈伤组织中 HRGP 的氨基酸组成[26]

Table 1 Amino acid composition of HRGP from tobacco callus tissue

氨基酸	含量 (mol%)	氨基酸	含量 (mol%)
羟脯氨酸 Hyp	38.0	半胱氨酸 Cys	0.22
天冬氨酸 Asp	5.5	蛋氨酸 Met	0.20
苏氨酸 Thr	5.6	异亮氨酸 Ile	0.27
丝氨酸 Ser	8.9	亮氨酸 Leu	0.75
谷氨酸 Glu	0.43	酪氨酸 Tyr	12.2
脯氨酸 Pro	8.4	赖氨酸 Lys	12.4
甘氨酸 Gly	0.44	组氨酸 His	5.0
丙氨酸 Ala	1.2	缬氨酸 Val	5.2

2. 类 别

1985 年以前人们习惯上将 HRGP 分成 3 类[4]：第一类是伸展素(extensin)，为 HRGP 中最具典型性、也是研究最多的一类。羟脯氨酸和脯氨酸是其蛋白质氨基酸的主要成分，二者占总氨基酸的 30－55%；丝氨酸的含量仅次，此外还含缬氨酸、酪氨酸、组氨酸、赖氨酸或其中的一种。它在植物发育的某阶段先以可溶状况存在，随植物生长发育而最终沉积在植物细胞壁上，这是靠羟脯氨酸糖基化、并在不同细胞器中完成的过程。第二类 HRGP 是茄科植物凝集素(solanaceous lectin)，以作为寄主植物-病原细菌非亲和性识别的植物识别子(cognor)而著称[5,6,8]。第三类是半纤维素或阿拉伯半乳聚糖蛋白质(arabinogalatan protein)，主要是植物细胞壁的一种结构成分[3]。另外，Chen 和 Varner(1985)在首次克隆伸展蛋白的 cDNA 时，分离到一种新的 cDNA 克隆，它编码富含羟脯氨酸、同时富含脯氨酸的蛋白质，称为富含羟脯氨酸和脯氨酸的蛋白质(hydroxyproline-proline-rich protein，H/PRP)。在目前已发现的 7 个 H/PRP cDNA 或基因组克隆中，有 5 种的 H/PRP 是糖基化的，所以这类 H/PRP 被归为第四类 HRGP，现已获得 3 种 H/PRP 和至少十多个基因组克隆，从菜豆细胞壁中分离到的一种 H/PRP，其羟脯氨酸和脯氨酸的含量大致相等[4]。

Chen 和 Varner 的研究在两方面属于首创并带动了人们对 HRGP 研究的兴趣：①克隆出第一个伸展蛋白的 cDNA；②首次发现在参与植物生长发育和植物-微生物互作的 HRGP 中的第四类，即 H/PRP。此后人们针对这两类 HRGP，通过对纯化的 HRGP 中的蛋白质氨基酸顺序的测定和由 cDNA 推导氨基酸顺序的研究，明确了 HRGP 的许多重要的分子生物学特征，最主要的就是顺序的保守性和重复性。

3. 氨基酸顺序的重复性和保守性

伸展蛋白中的肽链是一条高度有序的氨基酸重复序列，重复序列中通常含有一个也是重复的五肽顺序 $Ser(Hyp)_4$，排列成如 $Ser(Pro)_4-Ser-Pro-Ser-(Pro)_4-(Tyr)_3-$ Lys 的高度有序的序列[4]。但不是所有的伸展蛋白都含有多个 $Ser(Hyp)_4$ 单元，从玉米和甜菜分离的 cDNA 克隆的蛋白质或直接分离的蛋白质虽在等电点、羟脯氨酸和脯氨酸的含量、重复序列等方面具备伸展蛋白的许多特征，但其氨基酸序列不含或只含一个 Ser

$(Hyp)_4$ 重复单元[3,4,7]。

表 2　几种豆科植物 H/PRP cDNA 克隆

Table 2　Repeating properties of H/PRP cDNA colones from leguminous plants infected by *Rhizobium* (*Bradyrhizobium*)[4]

植物	cDNA 克隆	重复单元	拷贝数
大豆	GmENOD2	Pro－Pro－His－Glu－Lys	>1
		$(Pro)_3$－Glu－Tyr－Gln	>1
豌豆	PsENOD2	Pro－Pro－His－Glu－Lys	
		$(Pro)_3$－Glu－Tyr－Gln	
	ENOD12	Pro－Pro－Gln－Lys－Glu	
		Pro－Pro－$(Xaa)_3$	
三叶草	A2ENOD2	Pro－Pro－His－Glu－Lys	
		$(Pro)_3$－Glu－Tyr－Gln	

与伸展蛋白的情况相似，不同的 H/PRP 序列也是高度重复的，通常只有少数几个氨基酸不同[1]。它们与伸展蛋白的不同是，重复序列中完全不含 Ser $(Pro)_4$ 单元。从大豆的 3 个 cDNA 克隆(SbPRP1、SbPRP2、SbPRP3)的情况看，普遍存在的是 Pro－Pro－Val－Tyr－Lys 和 Pro－Pro－Val－Glu－Lys 的五肽顺序。从菜豆细胞壁分离的一种 H/PRP 其 N 端 18 个氨基酸顺序与由 SbPRO2 克隆的 N 端氨基酸序列完全相同。第一个重复单元中的第二个脯氨酸发生糖基化(成羟脯氨酸)。菜豆的另一个 cDNA 克隆，1A10，与 SbPRP1 有 94％的核苷酸顺序和 97.5％的氨基酸顺序同源。第五个克隆叫 1A10-2，从转录起点到第－534 核苷酸是编码区，与 SbPRP2 的相应区域完全相同。第六个克隆，p-33 来自胡萝卜，含有 Pro－Pro－Val(Ile)－His－Lys 和 Pro－Pro－Val－Tyr－Thr 重复单元的数个拷贝[4]。

豆科植物受根瘤菌侵染后可产生 H/PRP，已获得的 cDNA 克隆在重复单元上与上面几种克隆不同，主要在五肽顺序上，而且多含有一个六肽重复单元(表 2)。

4. 在植物体内的形成和定位

HRGP 的形成是在特定细胞器中分阶段完成的[4]。它们的多肽前体在细胞质中合成，然后通过质膜通道分泌到细胞间隙，这个过程取决于肽链上的疏水引导序列。由此形成不带碳水化合物的 HRGP 前体，它需要插到粗面内质网(ER)上。单子叶植物 HRGP 的大部分脯氨酸或羟脯氨酸就在 ER 上发生糖基化[3,9]，而双子叶植物的 HRGP 前体需要转到高尔基体上，在那里联结上碳水化合物组分；不同 HRGP 糖基化程度差别很大，并对羟脯氨酸的位置显示出选择性[7]。最后形成的 HRGP 通常插到细胞壁上，在细胞壁上的定位一般要在壁的其他组分沉积之后填充进去。内填的途径因 HRGP 的植物来源而有所不同，胡萝卜伸展蛋白-1 看来是从高尔基体直接向细胞壁填充，不能在细胞间隙和中胶层积累；而烟草受到烟草花叶病毒(TMV)侵染而形成的 HRGP 则可以穿过中胶层在细胞间隙积累，并可以沉积到维管束的不同细胞上，这就使 HRGP 更具有抵抗各种病原物扩展的能力。

三、诱导发生和在植物-病原物互作中的功能

1. 转录水平上的刺激

HRGP 的诱导合成被证明是由转录激活实现的，可以作为刺激信号的因子有创伤、病原物侵染、植物-病原物互作的非亲和信号、来自寄主植物或(和)病原物的激发子、外源和内源激素等[4,9-11]。

对哪种信号作出反应，首先由 HRGP 编码基因的分工所决定[4]。所有 HRGP 的编码基因都在染色体上排成一个多基因(位点或成员)簇，每个成员负责对某种刺激信号发生反应[2,9,10]。其次，这些分工负责的基因成员可以产生不止一种转录本，对一种以上刺激信号作出反应。第三，一个基因或其转录本对不同刺激信号的反应可能正好是反向的：某个信号可以刺激表达而合成 HRGP，而另一个信号则可能抑制表达[4]。表 3 是菜豆和胡萝卜几种 HRGP 基因对信号的反应情况，可以说明以上 3 个特征。最后，负责接受信号的是基因中的靶序(target sequence，TS)，例如，胡萝卜 1.8kb 基因(参见表 3)含两个转录调控元件，一个在制约启动子的两个 TATA 盒之间；另一个在更上游的－719——658bp 之间[13]，它决定转录表达能否达到最大量。因此，前一个元件是作为反应元件、而后一个是作为增强子分别起作用的。

表 3　几个 HRGP 基因对信号刺激的反应情况

Table 3　Signals or stimulation factors for activating HRGP genes in bean and stored carrot

基　因	专一信号	非专一信号	转录本	效　应
菜豆：				
HRGP2.11		创伤		加强
		侵染*		消失
HRGP2.13	创伤			加强
HRGP3.6	激发子**	侵染或激发子		加强
HRGP4.1		创伤		
			2.5kb mRNA	加强
			2.2kb mRNA	加强
胡萝卜：				
一个单基因		乙烯	1.8kb mRNA	加强
			1.5kb mRNA	减弱
		创伤	1.5kb mRNA	加强
			1.8kb mRNA	减弱

* 病菌为 *Colletotrichum lindemuthianum* (C. L.)；** 来自 C. L.

基因转录被激活后，从 mRNA 的合成、积累到 HRGP 的合成、积累是一种时序关系(timeliness)，所需时间长短因 HRGP 基因和信号种类而不同[2,4,9]。例如，当用病菌激发子诱导时，菜豆培养细胞的 HRGP4.1 和 HRGP2.13 基因仅经 2 小时的迟滞期就开始形成转录本，mRNA 在 12－24 小时内达到积累高峰；在相同条件下，HRGP3.6 和

HRGP2.11 基因转录本形成得更快，仅 2—4 小时内就达到积累高峰。胡萝卜受创伤刺激时，其 p-33 cDNA 克隆的 mRNA 在 1 小时内开始增加，2 小时内达到 50—100 倍，编码的蛋白质在 24 小时内增加 5 倍[4]。

2. 评价 HRGP 病理功能的 3 个方面

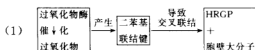
把 HRGP 的诱导发生和在植物细胞壁上的积累与植物抗病防卫相联系是很自然的，因为植物细胞壁不仅对直接侵入的病原物来说是第一道结构屏障，即使对伤口或其他途径侵入的病原物也是一个可以发生抵抗反应的场所，最著名例子如植物对病原细菌非亲和菌株的 ES 包围、固定和最终的过敏（HR）坏死[12]，更多的是通过细胞壁的自我修复[6]，一般认为 HRGP 的作用主要属于后一类[1,4]。

真正明确 HRGP 诱导发生与植物抗病防卫的关系，或评价它在植物抗病性中的作用，应该考虑 3 个方面。第一，肯定地认为 HRGP 是植物抗病防卫的一种因子，必须获得以下证据：①在有亲和性分化的植物-病原物互作体系中，HRGP 的诱导积累是非亲和性互作的特征；②在没有亲和性分化的体系中，HRGP 的诱导积累与植物抗病性增强密切相关，或 HRGP 的积累增强了植物的抗病能力。但实际情况是，前者主要在转录激活或 mRNA 的积累上建立了正向关系，而 HRGP 基因的诱导表达与植物最终抗病或感病并不总是一致的；后者的情况因病害体系而异。第二，HRGP 的诱导发生只是植物诱导抗病性所包括（依赖）的生化反应（有木质化、植物保卫素的诱导合成、PRP 的诱导积累等）中的一个环节，和其他反应一样，对它的作用应该从相互之间的关系（或抗病防卫反应的层次性）和协同作用等方面来评价。最后，HRGP 从根本上说是植物生命的一种因子，对植物抗病防卫的功能是在与病原物发生关系时派生出来的，抗病防卫反应能力的有无和大小除了取决于病原物侵染植物的手段和植物抵抗侵染的机制，还与 HRGP 被诱导积累的速度和程度有关，这也是植物诱导抗病性发生的一般规律[5]。

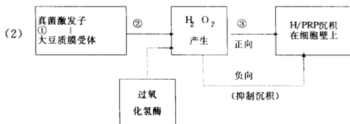
3. 病理功能

可以归纳为 3 方面：①通过早期识别诱发植物的非亲和抗性：HRGP 带负电荷，可以吸引带正电的粒子，如细菌，这是病原细菌的非亲和菌株能够吸附到寄主细胞上的一个正向力；然后，植物识别子（cognor）与细菌识别子（cognon）的结合引导出一系列导致 HR 的反应。本文 2 中提到的第二类 HRGP 即茄科植物凝集素，在非亲和性识别中可以作为 cognor 起作用。对此，董汉松已有专论[6,14]。②作为病原物侵入和扩展的屏障：不仅是在表皮细胞上，还可在植物体内部起到这种作用。HRGP 在表皮细胞上的积累可以阻止直接侵入的病菌，有证据表明，人工增加寄主细胞壁 HRGP 的量可以增强黄瓜对 *Cladosporium cucumerinum* 胞外致病酶（细胞壁降解酶）的抵抗力[15]；在有些寄主上，在 HRGP 积累量和抗病性增强之间，已建立了明确的相关关系（参见表 4）。HRGP 在植物体内细胞壁上的积累可以阻止系统侵染的病菌的扩展，而如前面提到的 TMV 侵染引起的 HRGP 在细胞间隙和维管束细胞壁上的积累，抗病作用可能不限于针对 TMV，对真菌和细菌更有意义，诱导抗病性在抵抗的病原物种类方面的非专化已多有报道[11,16]。③与其他抗病防卫反应的协同作用：这表现在两方面。第一，一般来说，植物抗病性在结构和生化上都是分层次起作用的，HRGP 即是参与结构抗性的因子之一，也是形成结构抗性的生化因子之一。

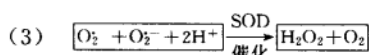
当结构抗性不能有效抵御病原物侵染时，植物就会调动下一步的抵抗反应。例如，马铃薯合成倍半萜类植物保卫素可以在晚疫病菌（*Phytophthora infestans*）非亲和小种侵染之后，由病菌激发子诱导合成；大麦对锈菌非亲和小种（无毒菌株）是在病菌侵入气孔的某个阶段中止它的进一步活动[14]。第二，在植物诱导抗病性的不同机制中，HRGP 的诱导发生与其他反应相互关联。例如过氧化物/过氧化物酶系统和 H_2O_2/过氧化氢酶系统，与 HRGP 之间有两种截然不同的联系：

（1）


这一过程已被证明可以增强黄瓜对 *C. ocucumericum* 的系统抗性[8]；

（2）


①中的激发子来自大雄疫霉（*Phytophthora megasperma* var. *glycinea*），最初被证明的主要功能是诱导大豆的植物保卫素——大豆素（glyceollin）的合成；②中的 H_2O_2 作为一种二级信使起作用；③中的 H/PRP 是一个 30kDa 的蛋白质，它受激发子和其他因子（如谷胱苷肽）刺激后在细胞壁上的沉积非常快，5 分钟内开始。（2）所表述的过程可以再和超氧化物（$O_2^{\cdot-}$）/超氧化物岐化酶（SOD）系统联系起来：

（3）


这就是说，SOD 酶在消除活性氧和自由基及参与有关植物抗病反应的同时，可以产生诱导 HRGP 和植物保卫素等反应的二级信使 H_2O_2。

针对这 3 个方面，表 4 总结了 HRGP 在几个植物-病原物互作体系中的发生及与抗病性的关系，我们的注意力主要放在 HRGP 与其它防卫反应的联系上。

最后，就已研究过的病害体系看，HRGP 与植物抗病性增强及与非亲和性互作中 HR 反应的正向相关，在转录激活水平上比在 HRGP 积累水平上获得的证据更充分。在有些病害体系中，mRNA 的诱导产生并不一定导致它所编码的 HRGP 具有抗病功能，但 mRNA 的产生和产生量往往与抗病性的诱导和抗病程度表现正向相关。这就是说，HRGP 作为防卫反应分子，可能更多地受到翻译水平（从 mRNA 到蛋白质）的调节或生化因子的影响。但有一点必须指出，无论是 HRGP 基因，还是 PR 基因，对转录调控可能包括的其他机制，如内含子序列是否在 mRNA 前体形成后被切除，或 mRNA 的寿命与 HRGP 等基因产物形成量的关系等这些影响最终表型的因素，都是还未被涉及的方面。

4. 豆科植物-根瘤菌体系中的 H/PRP

Wycoff 等[1]最近在他们关于富羟糖蛋白的综述中，比较全面地介绍了 H/PRP 参与豆科植物-根瘤菌共生互作的研究状况。这个体系中的 H/PRP 是植物 H/PRPs 中功能比较明确的一类。从已获得的 4 个 cDNA 克隆(参见表 2)看，它们可以受创伤、根瘤菌和豆科植物寄主来源的激发子诱导，具有对诱导信号快速反应而合成相应 H/PRP 的能力，但不能被病原物的侵染所诱导。研究表明它们的诱导表达与根瘤菌的染色体基因无关，而主要受共生质粒(Smp)上的 nod 基因控制；nod 基因控制的这种表达受乙烯抑制，对一般的植物病原物的侵染不发生反应；其中 nodA 或 nodG 基因看来负责控制根瘤菌激发子的形成，可能还有它的传导。这类 H/PRP 的功能看来主要是在根瘤的早期发育阶段、参与根瘤菌类囊体对氧的阻隔作用的结构的形成，在发生顺序上处在豆科植物-根瘤菌互作 9 个阶段的第 5、6 阶段之间，即侵染线形成与根瘤启始、发育之间(参见文献〔20〕的表 1)。

表 4 HRGP 参与作用的植物-病原物互作举例[4,11,15-19]

Table 4 Samples of HRGP to take part in plant-microbe interactions

互作体系	刺激信号	HRGP 诱发动态	植物的抗病表现	与其他防卫反应的关系
菜豆-*Colletotrichum lindemuthianum*	激发子侵染	HRGP4.1、HRGP2.13、HRGP3.6 三个转录本生成，在细胞壁上积累 HRGP	非亲和：三个转录本及 HRGP 在维管束薄壁细胞、皮层、表皮呈梯度积累，有效阻止侵染 亲和：只在维管束薄壁细胞积累，病菌已侵入维管束	1. 说明 HRGP 的基因活化靠系统的信号 2. 细胞壁木质化伴随发生
黄瓜-*C. cucumerinum*	热处理(50℃ 40 秒) 预接种加入 HRGP	HRGP 积累 HRGP 积累 抗真菌酶解	发病变轻	多种反应
3. 甜瓜-*C. lagenarium*	侵染、激发子、乙烯诱导	5 种 mRNA 诱导发生，HRGP 积累	增强寄主抗病性	有些激发子可诱导植物保卫素
4. 番茄-*Fusarium oxysporum radicis-lycopersici*	侵染	HRGP 在侵染点周围细胞壁及其微纤丝物质和类乳突加厚的部位积累	不能阻止侵染	此 HRGP 与甜瓜 HRGP 的抗血清免疫交叉
5. 烟草-TMV	侵染	HRGP 在坏死斑从内到外按依次递减的梯度积累，并在维管束系统积累	与抗病性无相关	1. 此 HRGP 与甜瓜 HRGP 有血清学同源 2. 可能导致多抗性 3. 暗示翻译后调控的作用
6. 菜豆-及甜瓜-*Pseudmonas syringae* pv. *phaseolicola*	非亲和信号	HRGP 在过敏坏死细胞周围积累	最终形成过敏反应	与包围结构的形成有关，参与非亲和性抗性

在对豆科植物-根瘤菌互作早期反应的研究中，有著名的 Lippincott 和 Lippincott 的植物地上部破伤接种系统和 Matthysse 的悬浮培养系统[20]，两个系统在寄主和共生菌参与作用的生化因子上的研究结果存在不少差异和难于解释的问题，而上述这类专门参与豆科植物-根瘤菌早期互作的 H/PRP 的发现和功能验证，对这些问题可以提供比较满意的解释。对此问题的展开叙述已超出本文范围，读者可参阅文献[12,20,21]。

四、HRGP 基因在植物生长发育中的表达和调控

1. 在生长发育过程中的表达

从参与植物生长发育的作用来看，所有 HRGP 都表现出以下 3 个特点[4,22,23]：①在特定器官或组织的细胞壁上定位并担负特定生理功能；②其基因在生命活跃的组织、细胞中表达水平最高；③基因表达受某种激素的调节。以下略举几例。

大豆的一种伸展蛋白在开花后 16－24 天的栅栏组织表皮细胞和滴漏细胞壁上积累最为迅速，最后在种皮中沉积，可能有保护种子休眠的作用。定名为 sbPRP 的基因簇有 3 个成员得到鉴定，sbPRP1 可在大豆下胚轴的不同细胞、sbPRP2 在皮层和下胚轴维管束、sbPRP3 在下胚轴伸长区中柱细胞各表现组织特异性表达[23]。玉米愈伤组织由乙烯诱导产生的一种 HRGP 由一个含 582bp 启动子的基因编码，该基因在玉米植株的维管束系统表现组织特异性表达[9]。另一种受生长素 2,4-D 调节的 HRGP 在根尖和胚芽等分裂中的细胞内表达特别活跃，它的 mRNA 的持续水平与细胞分裂能力呈正的相关关系，当细胞开始分化时，转录本 mRNA 的量随之降低；2,4-D 的调节表现为依量的不同促进或抑制转录[4]。烟草的一种 HRGP 基因在侧根生长过程中表达，从中柱鞘和内皮层细胞到成长中侧根的顶端细胞，基因表达程度依次增高，当侧根穿出表皮后，表达立即停止[3,22]。因此，这种 HRGP 被认为有保护侧根免受机械损伤的作用。烟草的另一种 HRGP 基因，伸展蛋白基因的表达通常只限于根、茎细胞，但在 Ti 质粒介导的含细胞分裂素的转基因烟草植株中，该基因在叶片中的表达能力提高 100 倍[4]。

2. 调控因子

根据已有的研究，HRGP 基因在植物不同器官或组织中的表达是由其特定核苷酸区段分工负责的；植物细胞中可能既存在表达的抑制子，也有这种抑制子的抑制子[4,13]。

菜豆 HRGP4.1 基因(参见表 3)可以在根尖、茎节细胞中表达，也可以为损伤刺激而表达，还能在柱头细胞中表达；根据对对应插入报道基因的转基因烟草所做的表达分析，负责在前 3 种条件下表达的核苷酸序列都位于转录起始点的－250 到－93bp 之间，而控制在柱头中表达的序列位于这个区段 700bp 以外的上游区[4]。在不同报道中被称为启动子的序列[3,9,13]，看来实际上都是作为反应元件起作用，即 TS 序列，分段切除转化表达时，缺失效应并不连续。

在胡萝卜细胞核中发现一种蛋白质，称为“伸展素基因联结因子-1”(extensin gene-binding factor-1，EGBF-1)，足纹法分析表明，它保护的区段是伸展蛋白基因 1.8kb 转录本(参见表 3)转录起点的－270 到－310bp 之间的序列。EGBF-1 的活性受损伤信号和乙烯抑制，而这两种信号可以诱导这个 1.8kb 转录本 mRNA 的积累，因此被认为是伸展蛋

白基因转录的抑制子。在胡萝卜中还发现一种热稳定的蛋白质，分子量大于 12kDa，可以抑制 EGBF-1 的活性[4,13]。在持续的研究中，Granell 等(1992)[13]又发现了另一种抑制性蛋白质，称为伸展素联结蛋白质(extensin-binding protein，EBF)。EBF 看来是一种组成型因子，但可为创伤诱导而消失；它联结到一段 DNA 片段上，当这个片段缺失时，伸展蛋白基因诱导表达的水平可以达到 48%，说明 EBF 抑制的可能是增强子序列。

3. HRGP 基因的进化论意义

有两组研究结果值得注意，一是 Murphy 和 Hood(1993)[24]对玉米不同种(species)伸展蛋白分子量大小的研究，他们使用了甜玉米杂交种 G×B(品种 Golden×Bantam)和日本系品种 JHL。伸展素可以在它们的穗丝和果皮中积累，杂交种 G×B 只产生 66kDa 的伸展素，品种 JHL 产生两种大小的分子，76 和 66kDa；JHL 可产生 1.9 和 1.5kb 两个转录本，G×B 只产生 1.5kb 一个转录本。另外，JHL 和 G×B 都能产生 6.2 和 4.5kb 两个大转录本，但在 G×B 中只有一个得到翻译，产物 56kDa，JHL 可翻译两个大转录本，产物除 56kDa 外，还有一种 66kDa 的蛋白质。他们的结论是，玉米品种间伸展素分子大小的差别是因为分子中肽长度的不同，而不是因为糖基化链的长短。十分重要的是：肽是基因的一级产物。

另一组结果是 Raz 等(1992)[22]关于玉米及近缘种 HRGP 基因"易变序列"的研究，使用了玉米(*Zea mays*)两个品种(Acl503 和 W22)、玉米草(*Z. diploperennis*)和高粱(*Sorghum vulgare*)的各一个品种。在玉米和玉米草中，紧靠 TATA 盒的上游区 500bp 序列高度保守，但只有后面跟的一个伸长序列可以在高粱中发现；再上游区域中，即使在玉米的两个品种中也发现了序列重排。根据这些结果，它们假设以上 4 个品种的 HRGP 各由一个基因编码，进一步研究表明 4 个基因 5'端是共同的并为基因表达所必需，变异发生在 3'端，主要是由于少量重复和一个核苷酸的替换造成。这个区域内还含一个内含子，在 4 种基因中序列高度保守。但编码区异别很大，变异主要来自其中一个小区段的重复和只有一个核苷酸的替换，这个染色体重复的小区段编码蛋白质中相似的肽链片段。最后的结论是，这种序列的变异可能是因为基因所受的应力或选择压力不同或作为每个区段的特性，由多种机制造成，包括点突变、转座因子插入和切离、同源重组和不对等交换等。

这两组结果启示了这样一种假设：HRGP 基因在进化上来自一个共同的祖先家族，在相近物种中只有少数功能分区或序列的变异；这种变异在自然条件下发生的频率并不高，因为所有诱导刺激都未发现可以引起核苷酸序列的重排和核苷酸的替代。这就勾勒出植物物种进化和植物-微生物共同进化的景象：某个物种的祖先所有染色体都是相同的，进化过程中每条染色体和类似于 HRGP 基因族的小的变异(微观进化)就导致新的物种产生(宏观进化)。这已经不是新的理论，只不过对高等植物来说是一个复杂的过程，而对只有一条染色体的细菌来说却相对简单得多，例如，大肠杆菌(*Escherichia coli*)和沙门氏杆菌(*Salmonella typhiurium*)被认为起源于 1.2 亿年前的一个共同祖先，但染色体基因图谱非常相似，相应功能的基因和复制的启始位置都按相同的次序排列，变化只是一个大的区段倒位、许多短序列的添加和缺失以及同一个基因中众多序列的重排(参见文献〔25〕的结论——Conclusions 部分)。这很可能就是植物不同染色体在进化中变异的大致情况。

五、结　　语

对它们在植物-病原物互作和植物抗病防卫反应中的意义来说，富羟糖蛋白（HRGP）是被作为植物第一道结构防线来考察的。但是，我们必须把它们当作植物抗病防卫反应的效应大分子之一种来对待，并且需要有一套系统的概念。例如，HRGP 之一类的茄科植物凝集素，必须放在植物-细菌非亲和性互作从接触识别到 HR 最后形成这一串事件中来评价；H/PRP 在豆科植物-根瘤菌互作中的作用也是这个道理；更不用说作为结构抗性因子的其他 HRGP，它们更是结构抗性因子诸如木质化、乳突、侵填体等之一种，但 HRGP 的作用显得比较突出。其次，H_2O_2 作为二级信使的功能似乎可以把几种主要的防卫反应穿成一串（responsive sequences），与抗病防卫的原初诱发因子即信号物质如 elicitor 一样日益受到重视，但我们已经看到试图弄清防卫反应每个生化和代谢环节的努力往往都把事件复杂化，关键是难以找到在抗病防卫中起关键作用的因子。因此，明确某个病害体系中起关键作用的防卫反应并对它进行强化，是对诸如 HRGP 的功能分子进行基因功能和调控研究、并以此寻找利用这些基因改造植物抗病性的途径所应特别注重的。最后，关于 HRGP 进化起源的研究虽然还很少，但它会揭示出更多的意义，不仅对 HRGP，还对其他防卫反应的功能因子。

参　考　文　献

[1] Millar, D. J., Slabas, A. R., Sidebottom, C., Smith, C. G., Allen, A. K., Bolwell, G. P., A major stress-inducible Mr-42000 wall glycoprotein of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Planta, 1992, **187**: 176－184.

[2] Fristensky, B., Horovitz, D., Hadwiger, L. A., cDNA sequences for pea disease resistance response genes, Plant Mol. Biol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Genet. Eng., 1988, **11**: 713－715.

[3] Kieliszewski, M. J., Kamyab, A., Leykam, J. F., Lamport, D. T. A., A histindine-rich extensin from *Zea mays* is an arabinogalactan protein, Plant Physiol., 1992, **99**: 538－547.

[4] Wycoff, K. L., Dixon, R. A., Lamb, C. J., Hydroxyproline-rich glycoproteins in plant microbe interactions and development. In Molecular Signal in Plant-Microbe Communications (Verma, D. P. S., ed.), Boca Raton: CRC Press, 1992, 407－422.

[5] Goodman, R. N., Kiraly, Z., Wood, K. R., The Biochemistry and Physiology of Plant Diseaes, Columbia: University of Missouri Press, 1986, 1－45, 347－416.

[6] 董汉松，植物识别子与病原细菌识别子间的互作，植物生理学通讯，1991，**27**: 391－396。

[7] Kieliszewski, M. J., De-Zacks, R., Leykam, J. F., Lamport, D. T. A., A repeatitive proline-rich protein from the gymnosperm *Douglas fir* is a hydroxproline-rich glycoprotein, Plant Physiol., 1992, **98**: 919－926.

[8] Millar, D. J., Allen, A. K. Smith, C. G., Sidebottom, C., Salbas, A. R., Bolwell, G. P., Chitin-bining protins in potato (*solanum tubeosum* L.) tuber: characterization, immunolocalization and effects of wounding, Biochem. J., 1992, **283**: 813－821.

[9] Tagu, D., Walker, N., Ruiz-Avila, L., Burgess, S., Regulation of the maize HRGP gene expression by ethylene and wounding, mRNA accumulation and qualitative expression analysis of the promoter by microprojectile bombardment, Plant Mol. Biol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Genet. Eng., 1992, **20**: 529－538.

[10] Corbin, D. R., Sauer, N., Lamb, C., Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants, Mol. Cell. Biol., 1987, **7**: 4337－4344.

[11] Madamanchi, N. R., Kuc, J., Induced systemic resistance in plants, In The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals(Cole, G. T., Hoch, H. C., eds.), New York: Plenum Press, 1991, 347－362.
[12] 董汉松,病原细菌对寄主植物吸附的细胞生物学,烟台师范学院学报(自然版),1991,**7** (2):66－73。
[13] Granell, A., Pereto, J. G., Schindler, U., Cashmore, A. R., Nuclear factors binding to the extensin promoter exhibit differential activity in carrot protoplasts and cells, Plant Mol. Biol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Genet. Eng., 1992, **18**:739－748.
[14] 董汉松,寄主植物与病原微生物间的相互识别,农业生物技术进展与展望——国家 863 计划生物技术领域第一主题学术研究讨会论文选编'92(贾士荣主编),合肥:中国科学技术大学出版社,1993,65－79。
[15] Stermer, B. A., Hammers-Chmidt, R., Association of heat shock induced resistance to disease with increased accumulation of insoluble extensin and ethylene synthesis, Physiol. Mol. Plant Pathol., 1987, **31**:453－467.
[16] Kuc, J., Plant immunization mechanisms and practical implications, In Active Defense Mechanism in Plants (Wood, R. K. S., ed.), New York: Plenum Press, 1982, 157－178.
[17] Kuc, J., Plant immunization and its applicability for disease control, In Innovative Approaches to Plant Disease Control (Chet, I., ed.) New York: John Wiley & Sons, 1987, 255－274.
[18] 董汉松,植物诱导抗性的机制和应用前景,植物抗性生理研究(赵可夫主编),济南:山东科学技术出版社,1992,193－201。
[19] Mazau, D., Esquerre-Tugaye, M. T., Hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation in the cell walls of plants infected by various pathogens, Physiol. Mol. Plant Pathol., 1986, **29**:147－157.
[20] 董汉松,根瘤菌、根癌土壤杆菌与寄主植物相互识别的机制,山东农业大学学报,1994,**25**:367－373。
[21] Matthysse, A. G., Surface interactions between Grame negative bacteria and plant. In Molecular Determinants of Plant Diseases (Nishimura, S., Vance, C. P., Doke, N., eds.), Tokyo: Jpn. Sci. Soc., 1987, 97－118.
[22] Raz, R., Jose, M., Moya A., et al., Different mechanisms generating sequence variability are revealed in distinct regions of the hydroxyproline-rich glycoprotein gene from maize and related species, MGG, Mol. Gen. Genet., 1992, **233**:252－259.
[23] Wyatt, R. E., Nagao, R. T., Key, J. L., Patterns of soybean proline-rich protein gene expression, Plant Cell, 1992, **4**:99－100.
[24] Murphy, J. M., Hood, E. E., Molecular basis for extensin size heterogeneity in two maize variteies, Plant Mol. Bol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Genet. Eng., 1993, **21**:885－893.
[25] Coplin, D. L., Plasmids and their roles in the evolution of plant pathogenic bacteria, Annu. Rev. Phytopathol., 1989, **27**:197－212.
[26] Mellon, J. E., Helgeson, J. P., Interaction of a hydroxyproline-rich glycoprotein from tobacco callus with potential pathogens, Plant Physiol., 1982, **70**:401－405.

HYDROXYPROLING-RICH GLYCOPROTEINS AS RELATED TO DISEASE DEFENCE OF PLANTS

Dong Hansong, Liang Yuancun, Liu Aixin and Liu Yanrong

Hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) are linear molecules cross-linking cell wall polymers in plants. The carbohydrate components attach O-glycosidically to the hydroxyproline or/and other basic amino acid residues, which make HRGPs linear and rod like, and positively charged. HRGPs are found to be in 4 groups: extensin, solanaceous

lectin, arabinogalactan protein, and hydroxyproline- and proline-rich proteins (H/PRP), each with different function in plant development and in plant-microbe interactions. The GRGP proteins are highly repeats in their amino acid sequences, for extensin usually containing the repeating pentapeptide Ser $(Hyp)_4$ within a higher-order repeat such as $Ser(Pro)_4$-Ser-Pro-Ser-$(Pro)_4$ — $(Tyr)_3$ — Lys, while for H/PRPs both the pentapeptides such as either Pro — Pro — His — Glu — Lys, or Pro — Pro — Gln — Lys — Glu &. Pro — Pro $(Xaa)_3$ and hexapeptides such as $(Pro)_3$ — Glu — Tyr — Gln. The higher-order repeats can be used to distinguish different classes of HRGPs.

Molecule integeration of a given HRGP completes in special cellular apparatus. The peptide precursors form in the cytoplasm and transduct into extracellular spaces as carbohydrate-free (CF) proteins. Glycosylation of the proline residues of the CF proteins is acomplished either on the endoplastic reticulum (ER) or in the golgi apparatus after the proteins to pass through the ER. Intussusception and accumulation in the cell wall usally follow different manners in different HRGPs.

Expression of HRGP genes is transcriptively activated by given signals, which are one or more of the following factors: wounding, exo- and endo-genous hormones, elicitors from pathogens or/and plant hosts, incompatible signals of plant-pathogen interactions, and infection by pathogens. The transcription activation is genetically controlled by the multigene families for HRGPs encoding, in which different individual members are responsible specifically or nospecifically for one or more signals. When a member of the mutigene families responsive to more than one signals, it can produce more than one transcripts countering each signal. After HRGP genes to be activated, time sequences are followed in the mRNA and HRGP accumulations.

It is reasonable to deduce, from researches, the function and significance of HRGPs in plant-microbe interactions and in plant defences against disease, since the molecules are localized on the cell walls which are believed to be the first barrier of plants to resist pathogen invasion. But before making the evaluation, we would understand comprehensively the following 3 aspects.

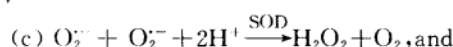
(1) The conclusive correlation of HRGPs with the plant defence must be supported by 2 kinds of evidences: the materials are positively correlated with incompatible rsponses finally indicated by hypersensitive (HR) resistance of the hosts in plant-pathogen interactions which show the compatibility differentiation; the accumulation of HRGPs leads to, at least is positively correlated to the resistance enhancement of the hosts in pathosystems which show no compatibility differentiation. In fact, good evidences for the above 2 aspects are obtained frequently more in the gene transcription level than in phenotype that HRGP accumulation makes plants increase their disease resistance.

(2) HRGPs should be considered connecting together with other responsive events involved in the induced plant resistance. For instance, three responsive systems of enzymes, peroxidates/peroxidases (PODs), superoxidates ($O_2^{\cdot -}$)/superoxide dismutases

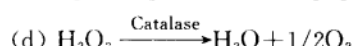
(SODs), and H_2O_2/catalase can be contributed to or affect the elicitation of not only HRGPs but also phytoalexins and other related responses, by a secondary messenger H_2O_2 in its response sequences as follows:

(a) Peroxidates $\xrightarrow{POD}$ bipheny linkages → HRGP-plant cell wall cross-linking;

(b) Elicitors (signals) $\xrightarrow{via}$ cytoplasm → H_2O_2 production → the elicitation of HRGP, etc.;



(c) $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$, and



(d) $H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} H_2O + 1/2O_2$

(3) HRGPs are fundamentally the elements of plant life and development, and are awarded disease defense significance when plants in which the HRGPs exist or are ptoential to produce interact with pathogens. Degree of the disease resistance given by the HRGP elicitation is dependent on the speed and magnitude with which the HRGP genes are activated to express, as a rule induced resistance of plants against diseases follows.

According to the criteria just talked above, functions of HRGPs to take part in plant-pathogen interactions and in disease defense of plants are suggested as 3 aspects: ①participating in HR resistance by the specific recognition between plant hosts with (solanaceous)lectin as cognor and incompatible bacteria with lipopolysaccharides (LPSs) as cognon; ②taking roles as plant barriers to resist invasion by pathogens, and ③acting in coordination with other responsive events to contribute to induced resistance of plants against diseases. For the 3 function, a more detailed talbe is presented in the text to involve the related researches on different plant-pathogen interactions.

As a distinguishable kind of HRGPs, H/PRPs are found in some plant-microbe interactions, and those from legume show special roles in initiation and early development of the nodules. For this, brief mentions are given.

In the 4th section of this paper, expression of HRGP genes and their regulation during plant development are discussed. Especially, we have extremely detailed the two group results of HRGP genetics in maize: one is that the extensin size heterogeneity between the plant species is contributed directly by the gene encoding, and the other is the demonstration that sequence variability in the gene can be induced to occur by different mechanisms, both of which are awarded of exited significance in plant-microbe coevolution given by HRGP as one of the plant defence elements. As concluding remarks, it is emphasized that HRGP genes be among the latent and inducible plant genes by which the encoded products are influenced more complicated than the transcription activation for the function in plant disease defenses, and that HTGPs be deduced as an element of the defense within the background of overall elements involved in induced resistance of plants to diseases.

第二部分　植物诱导抗病性的利用策略

植物诱导抗病性的机制和应用途径

董汉松

Bernard[1]早在1909年报道，用根腐病菌(*Rhizoctonia repens*)的弱毒株预接种兰科植物根部，可使鳞茎免受强毒株的侵染；预接种诱导寄主产生具扩散性的兰醇(orchinol)，它对病菌有抑制作用[2]。1950—1970年间，诱导保护作用在各种植物病害中被广泛报道，不同的人先后使用了交叉保护、后天免疫性、干扰、获得抗性、获得免疫性、诱导抗性等术语，其中以诱导抗性被认为比较确切。诱导抗性的最初概念是病原物第一次侵染诱发的植物抗病害防御[2]，后来发现各种胁迫作用均可诱发植物对病原物的抗性反应。Kuc在1983年[3]将诱导抗性的概念引伸为由各种胁迫、刺激或应力(统称为诱导因子)引发的植物对病原物致病性的抵抗作用；这些诱导因子通过激活植物的天然防御机制，使植物免受病原物危害或使危害减轻。

近10年来，对诱导抗性的研究在诱导因子种类和诱导抗性机制等方面取得了新的进展。在理论上，诱导抗性趋向于被作为与高等动物免疫系统具有类似功能的植物免疫机制来探讨；在应用研究中，它被认为是发掘植物内在抗性机制的一种新的病害治理对策[4a,5]（本文写成于1990年，收入本书时仅补充了少量文献）。

一、诱导因子种类

1. 非生物因子

包括物理和化学因子。机械或干冰损伤、电磁处理，可不同程度地诱导烟草对霜霉病(*Peronospora tabacina*)产生抗性[6]；局部热处理可使黄瓜抵抗炭疽病(*Cladospora cucumerinum*)的危害；X射线处理可减轻花叶病毒(IMV)对莴苣的侵染；用紫外线处理各种豆类的下胚轴，可使植株叶片获得对炭疽病(*Colletotrichum linderthianum*)的抗性[7,8]。

多种化学物质被用作诱导因子(表1)。其中多聚腺苷酸(PA)、乙酰水杨酸钠(SA)和2-氯乙烯膦酸(PCi)被较早地用于烟草对普通花叶病毒(TMV)的抗性诱导，也由此较早地发现了包括病程相关蛋白(PRP)的发生在内的分子学机制。

2. 微生物因子

(1) 真菌：真菌用作诱导因子在诱导物种类和保护的植物上均具广泛性(表2)。诱导因子组成包括病原和非病原菌、病菌致病力不同的菌株及不同结构和分子组分；保护的植物有木本、一年生和多年生草本；抵抗的病害有地上和地下部病害或局部侵染和系统侵染

的病害等。

(2)细菌:Brown 在 1923 年[9]报道,用根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的热杀死菌体接种的雏菊植株,当受强毒株侵染后不形成瘿瘤,这是细菌诱导植物抵抗病原细菌的最早报道。以后在叶斑型病害中研究较多。诱导因子组成有病原和非病原菌、死和活的菌体以及菌体的不同分子组分(表 3)。

表 1　对不同植物有抗性诱导作用的化学因子举例

Table 1　Examples of chemical inducers

植物	诱导物	抵抗的病原物	植物	诱导物	抵抗的病原物
烟草	乙酰水杨酸钠	花叶病毒(TMV)	黄瓜	水杨酸	花叶病毒(TMV)
		炭疽菌			炭疽菌
	乙烯利	花叶病毒		6—苯甲基氨基嘌呤	叶霉病菌
	聚腺苷酸	花叶病毒			炭疽菌
	2-氯乙烯膦酸	花叶病毒		磷酸盐	炭疽菌
	丙烯酸	花叶病毒	马铃薯	汞醋酸盐	多种病菌
		炭疽菌		奎尼酸	萎蔫镰刀菌
	β-芷香酮	叶霉病菌		苯丙氨酸	萎蔫镰刀菌
	人-α干扰素	霜霉菌			
		花叶病毒	苹果	乙酰氨基异丁酸	黑星病菌
黄瓜	苯硫脲	黑斑病菌	水稻	亚硝酸	白叶枯菌
	普鲁卡因	白粉菌		钠	长蠕孢
	乙酰水杨酸钠	炭疽菌		二氯乙烯环丙烷	稻瘟菌
	聚腺苷酸	炭疽菌	小麦	放线菌酮	叶锈菌

表 2　具有抗性诱导作用的真菌因子举例

Table 2　Examples of fungal factors with function of resistance induction

病害类型	保护的植物	诱导因子	抵抗的病原物
根病类	番茄、马铃薯、棉花	病菌弱毒株、菌根菌	根腐病菌、萎蔫菌
		非病原真菌	根腐病菌
维管束病害	甘薯、马铃薯、番茄、	病原菌的不同	
	甘蓝、石竹、亚麻	致病力菌株	各自的萎蔫病菌
	葫芦科植物	病菌温和菌株	
	棉　花	热杀死的孢子	黑白轮枝菌
叶部病害	板栗	病菌低毒菌株	叶斑病菌
	向日葵、亚麻、菜豆	病菌夏孢子、非病原菌	各自的叶锈菌
	烟草	病菌强、弱毒株	霜霉菌
		病菌弱毒株	赤星菌

(3)病毒:病毒的交叉保护现象于 1929 年首次报道[10],以后在各种植物上的研究表明,病毒作为诱导因子不仅可诱导植物对病毒的抗性,还可诱导植物对其他种类病原物的抗性(表 4)。

此外,Kuc 报道[11]用诱导过的烟草叶片的汁液处理未诱导的植株,可使其抵抗霜霉病。根腐线虫(*Pratylenchus penetrans*)可诱导烟草对黑胫病(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)产生抗性[12]。

表 3　具有抗性诱导作用的细菌因子举例

Table 3　Bacterial factors with roles of resistance induction

植　　物	诱　导　物	抵抗的病原物
梨、苹果	病菌非亲合菌株、菌体脂多糖(LPS)、非病原细菌	火疫病菌
黄　　瓜	病菌非亲和菌株、菌体 LPS 和胞外多糖(EPS)	角斑病菌、炭疽(真)菌
烟　　草	病菌非亲和菌株、LPS、EPS	角斑病菌
各种寄主	病菌细菌素产生菌株、菌体 LPS 和 EPS、细菌素	青枯菌
水　　稻	病菌 EPS	白叶枯菌
板　　栗	附生细菌	角斑假单胞菌
菜　　豆	病原菌、非病原菌	角斑病菌

表 4　具有抗性诱导作用的病毒因子

Table 4　Viruses with roles of rsistance induction

植　物	诱导因子	抵抗的病原物
烟　草	普通花叶病毒(TMV)	TMV、霜霉菌
	坏死病毒(TNV)	TNV
	黄瓜叶病毒(CMV)	CMV
	马铃薯病毒 Y(PVY)	PVY
黄　瓜	TMV	炭疽病菌
	CMV(坏死株系)	CMV 坏死株系、其他株系
	CMV 卫星 RNA	CMV
马铃薯	TMV	TMV
	TNV	TNV、CMV
绿　豆	TMV	TMV
曼陀罗	TMV	TMV
千日红	马铃薯病毒 X(PVX)	PVX
南　瓜	花叶病毒(SMV)	SMV 所有株系、茎腐病菌
西　瓜	花叶病毒(WMV)	茎腐病菌
	TNV	TNV

二、性质和机制

1. 进化论基础

根据共同进化论[13]的观点和基因对基因学说，就共同进化的遗传学来说，植物的抗病性和病原物的非致病性是显性的，而感病性和致病性是隐性的。植物在长期进化过程中保存了可以抵抗各种病原物的基因。其中某些基因控制植物的先天抗性，当植物受病原物第一次侵染时就可表达，这种抗性在表型上是可遗传的；另一些基因需经预刺激才能被活化为敏感状态，敏感状态的基因在植物受病原物侵染的过程中表达为抗病性，这种抗病性

即为诱导抗性，通常认为它在表型上是不遗传的[11]。在验证方法上，通常先对植物进行诱导处理，然后用病原物进行挑战接种以促使诱导抗性基因的表达。从表型机制来说，植物的抗病性不在于抗感基因的有无，而取决于这些基因的表达及其表达反应发生的速度和程度，这种速度和程度可由诱导刺激而加强[11]。

人们一直认为植物不具有免疫体系，主要理由是[13]：高等动物具有以抗原-抗体反应为主要特征的免疫功能，而植物则没有。但根据已有的关于病原物-寄主植物互作的研究结果，我们可以提出如下观点：植物具有与高等动物功能相似的免疫体系，差别仅是表达的方式不同。首先，在许多病原细菌-寄主植物互作体系中均可发生病原菌与寄主间的相互识别，识别的分子机制是植物识别子(cognor)和细菌识别子(cognon)间的特异性结合；cognor 与 cognon 在体外可以发生专化性免疫反应[14]，这与高等动物体系中抗原-抗体反应的分子机制相似。同时，cognon 在植物细胞壁上多是组成性的，但病原物的侵染可刺激它迅速合成[15]，如豆科植物的外源凝集素(lectin)、茄科植物的富羟糖蛋白(HRGP)，这也与动物抗体产生过程中的回忆反应相类似。最后，植物的诱导抗性不仅在功能上与高等动物的获得性免疫相同，都表现为抵抗病原物侵染，而且机制也有类似之处。例如，哺乳动物(包括人)受病毒侵染或其他刺激后可产生干扰素，这是一类在抗体产生之前诱导合成的蛋白质，对各种病毒有非专化性抵抗作用[16]。植物在诱导抗性发生过程中可产生不同类型的 PRP，这是一类与植物对不同病原物的抗性有关的低分子蛋白质，基本特征也是抗病性的非专化性[17]。同时，人干扰素基因向植物的转移和表达[18]以及其他类型的抗病基因工程[19]已缩小了植物和动物间免疫体系的差别。

上述关于植物免疫体系的观点，既可促进人们对植物诱导抗性及其功能的重新认识，又可促使人们从发掘植物免疫机制出发，探讨利用诱导抗性防治作物病害的途径。

2. 生物学

诱导抗性有 3 个时间参数，即诱导期、最大期和持久期，均以诱导因子、植物和病害种类而不同。诱导抗性的产生需要在诱导处理和挑战接种之间一个时间间隔，称为诱导期或迟滞期[3]，是植物对诱导刺激发生“免疫应答”或基因敏感化所需的时间，细菌用作诱导因子时一般为 72－96 小时[20]；真菌用作诱导因子时，时间的长短依病害种类而不同，在烟草赤星病(*Alternaria alternata*)中为 3 天[4b]，在烟草霜霉病中为 3－4 天[21]，在棉花枯萎病(*Fusarium oxysporum*)中为 5 天[22]。最大期是诱导抗性基因从刺激活化到获得最大表型效应所经过的时间，在烟草赤星病[4b]和霜霉病[21]中分别为 12 天和 21 天。持久期因病害不同而有很大差别，在烟草赤星病中为 21－28 天；霜霉菌孢子诱导的烟草对霜霉病的抗性可持续到开花结实期[21]，桃树接受病菌(*Cytospora cincta*)弱毒株诱导处理后，对枯枝病的抗性可持续整个生长季节[23]。

诱导抗性有局部性和全株性(系统性)两种情况，由晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)非亲和小种诱导的马铃薯对病菌亲和小种的抗性[24]，是最早报道的局部性诱导抗性的例子。由炭疽菌非致病小种诱导的菜豆对致病小种的抗性，在下胚轴破伤诱导接种时是局部性的，在注射接种时是系统性的[25]。用赤星菌的弱毒株对烟草下部叶或茎作诱导接种，可使上部叶获得对强毒株的抗性[26]。通过将正常植株接穗嫁接到诱导植物砧木上、诱导物标记跟踪等试验，证明系统性诱导抗性是诱导信号传递的结果[11]。

非专化性是诱导抗性的另一重要特征。表现为，对一种病害的抗性可由多种因子加以诱导；一种因子诱导产生的抗性对抵抗多种病原物都有效。烟草对赤星病的抗性可由几类化学物质、病原真菌、非病原细菌和多种病毒所诱导；Kuc[27]报道，对烟草作单因子诱导，可使其获得对至少12种病原物的抗性。

3. 组织病理学

抗性诱导包含了从植物细胞壁到细胞内部的一系列结构抗性反应。细胞壁强化是第一个环节。在烟草角斑病(*Pseudomonas aptata*)中，寄主叶片经非亲和菌株诱导处理后，可由香豆醇、松柏醇和芥子醇迅速合成木质素并在诱导接种位点周围积累[28]。木质化的加强在烟草对赤星病和霜霉病、各种作物对锈病、不同植物对叶斑型细菌性病害以及各种作物对不同病毒病的诱导抗性产生过程中均有发生[6]。在多种病原物非亲和小种诱导产生的植物乳突中有大量木质素积累[29]，植物有多种酶参与木质素积累过程[30]。

诱导产生的对病原物侵染的结构屏障还有气孔分泌物增多、气孔封闭[31]。马铃薯对黑胫病(*Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*)的结构性诱导抗性表现为皮孔裂殖和溶生的速度慢、程度低[32]。

在维管束系统病害中，诱导产生的结构抗性主要是侵填体和胼胝质的形成[31]。在大白菜软腐病(*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*)中，维管束屏障包括由侵填体、导管幕状结构、病菌纤维素微纤丝组成的三维空间封闭效应[15]。

4. 生理生化学

至少在病原物用作诱导因子的情况下，植物对诱导刺激和对病原物的侵染的反应有相似的机制。在各种植物的抗性诱导过程中，共同的反应有[11,33]可溶性碳水化合物和酚类物质含量增高、过氧化物酶和多酚氧化酶活性加强等。植物保卫素的产生和积累也与诱导抗性相关联[34a]，在烟草抗霜霉病的诱导中可发现6种倍半萜类植物保卫素[35]。在这些共同反应中，目前还未明确哪种反应或物质在诱导抗性中起主导作用，尤其是诱导抗性特异性的。但植物保卫素等有抗菌作用的物质的产生和积累，对抗病性显然是有意义的。

在烟草霜霉病中所作的研究表明有两种物质的产生表现出诱导抗性特异性，一种是富羟糖蛋白(HRGP)，一种是β-芷香酮(紫罗酮)。烟草茎部接受霜霉菌孢子注射诱导后，β-芷香酮在远离诱导部位的叶片中的含量增高50—600倍[36]，提取后也有诱导系统抗性的作用[37]。试验表明它的抗性诱导作用不取决于它对病菌的抑制效应[37]。茎部注射β-芷香酮并不引起它在叶组织中含量的明显提高[36]，说明植株接受诱导处理后β-芷香酮在叶组织中含量提高并不是这种物质传导的结果。以上现象表明，β-芷香酮是某种活性物质的前体，或起着释放某种活性物质的作用。

对β-芷香酮来源的研究有助于明确它在诱导抗性中起多大的作用。一种来源途径是，它由相应的类胡萝卜素分解产生，因为在它的分子链上有3位羟基化的发生。但β-芷香酮含量的迅速提高[36]说明这条途径的作用甚小。3位羟基化也可以是羟化酶作用的结果。因此第二种途径是在诱导后的植株中合成的：这要有乙酸-甲羟戊酸途径的关键酶和羟化酶的参与。那么需要的证据是植株接受诱导处理后这些酶的活性提高。有一项间接证据可以表明β-芷香酮是诱导合成的：使β-芷香酮发生酯化作用的酸类主要是分支或直链的短

链脂肪酸，其中有的含偶数碳原子[37]，这类脂肪酸在动植物中是极其罕见的。这就提出了一种可能，即它们是在抗性诱导过程中代射产生的。

在β-芷香酮诱导烟草对霜霉病的抗性的产生过程中，和病菌孢子用作诱导因子时一样也伴有烟叶增重和植株提早开花的现象[37]。这表明，β-芷香酮作为某种活性物质前体的作用还可能与成花素或光敏素的合成有关，同时对调节烟叶的香气和品质成分会发生作用。要明确这些问题，同样有待于与β-芷香酮生成或代谢去向有关的乙酸-甲羟戊酸途径的研究。

5. 分子学

烟草抗霜霉病诱导过程中特征性 HRGP 在挑战接种位点大量积累[36]，可以认为是与病原-寄主分子识别相关联的一种现象。HRGP 已被证明是多种植物细菌性病害系统中的 cognor，具有联结病菌菌体及其 cognon 的作用[14]。因此，对细菌菌体的识别和联结，可能是植物对细菌诱导抗性的机制之一。

关于诱导刺激使植物"诱导抗性基因敏感化"的分子机制，从对 PRP 及其 mRNA 的研究中已获得了明确认识。电泳分析表明至少有 10 种蛋白质与烟草对 TMV 的枯斑反应有关[38]。在烟草上已鉴定出 8 种 PRP，其中 4 种是几丁质酶[39]，另 4 种是β-1，3-葡聚糖酶[36,40]。在已鉴定的马铃薯 PRP 中，6 种是几丁质酶，2 种是β-1，3-葡聚糖酶[41]。烟草抗霜霉病诱导过程中产生的 PRP 主要是几丁质酶和β-1，3-葡聚糖酶，它们合成的高峰期正是诱导抗性最大期(21 天)[42]；这两类酶可通过分解病原真菌的细胞壁而起到保护植物的作用[36]。

对这些 PRP 的 mRNA 也作了检测，发现诱导前后有量的差别[43]，表明诱导刺激加强了诱导抗性基因表达的程度。现已成功地克隆出了编码烟草[44]和香菜[43]PRP 的基因，并体外合成了 PRP 的 mRNA[43,44,45]。由特异性 mRNA 反转录得到 cDNA，用 cDNA 探测 DNA 基因组，结果表明 PRP 是由一组基因编码的[46]。这不仅为"诱导抗性表达的强度和幅度取决于诱导刺激的强度和幅度"这一理论[5]提供了依据，而且表明旨在加强诱导刺激以加强诱导抗性表达效果的研究[26,47]在理论上是可行的。在抗病基因工程研究中，人们正试图由 cDNA 探测获得抗病基因，并把它引入产量、品质等性状好的品种。

三、结　　语

诱导抗性作为植物免疫体系的功能，它的非专化性(广泛抗病性)、系统性和持久性以及无公害的特征，正好弥补了目前病害防治措施的局限性或缺点[48]；它的应用，可望达到多抗、高抗和环境保护等多种目标。

将诱导因子直接施用于大田作物，对防治不同作物 TMV 和 CMV 花叶病已获得良好效果[48,49]；真菌性诱导因子已被初步直接应用，表明既可防病又能增产[11]。将特定诱导信号物质提纯分析并仿生合成后以药剂形式施用，是在提出"诱导抗性可以成为病害治理的新对策"时就有的设想[50]，从前面所述和实际情况看近期仍难做到，但关于芷香酮的研究和植物保卫素的诱导合成表明这是一条值得探讨的途径；激发子物质作为喷洒剂的应用也是人们关心的问题[33b]。第三条途径是通过组织培养将免疫作用转移给再生植株，将

其以无性繁殖的形式栽到大田中。现已将烟草对霜霉病的诱导抗性转移到了再生植株上[51]，但在其他病害中成功甚少；对诱导抗性能否通过组织培养转移还有争论。这条途径即使可能，也还有载培措施配套等方面的问题。第四条途径是诱导抗性通过种子传递的利用。TMV 诱导产生的烟草对花叶病的抗性可通过种子传递给后代植株[52]；化学诱导子 ID_1 和 ID_2 诱导的烟草对 TMV 的抗性经种子传递给子代植株后，逐代诱导有加强抗性的趋势[53]；在烟草赤星病上已获得更为系统和理想的结果。一般认为这种传递与(表型)遗传不同[11]，也未见生产实践应用的报道。如果诱导抗性能在子代植株稳定地表达，这条途径的应用前景显然是很可观的。最后一条途径是借基因工程实现诱导抗性基因的转移，尚在研究。

参 考 文 献

[1] Bernard, N., Ann. Sci. Nat. Bot., 1909, **9**:1.

[2] Gaumann, N., Rimpau, R., Phytopathol. Z., 1960, **38**:274.

[3] Kuc, J., In Beiley, J. A., Deverall, N. J. (ed.), The Dynamics of Host Defence, Acad Press, Sydney et al., 1983, 191.

[4a] 董汉松、王智发，中国烟草，1990，(2)10。

[4b] 董汉松、于建立，植物保护学报，1993；**20**：129。

[5] Kuc, J., ann New York Acad Sci., 1987, **494**:221.

[6] Dean, R. A., Kuc, J., Physiol. Plant Pathol., 1987, **31**:69.

[7] Cartwright, D. et al., Physiol. Plant Pathol., 1980, **17**:259.

[8] Langcake, P., Phil. Trans R. Soc. *London* B, 1981, **285**:83.

[9] Brown, H. A., Phytopathol., 1923, **13**:87.

[10] McKinuey, H. H., J. Agr. Res., 1929, **39**:557.

[11] Kuc, J., In CORESTA (ed.) Inf. bull 9th Tob. Sci. Cong, Guangzhou, China, 1988, 25.

[12] Mcintyre, J. L., Miller, P. M., Phytopathol., 1978, **68**:235.

[13] Van der Plank, F. E., Principles of Plant Infection, Acad Press, New York, 1975.

[14] 董汉松等，植物生理学通讯，1991，**27**：391。

[15] 董汉松等，山东农业大学学报，1991，**22**：207。

[16] 周瑞尔等，病毒免疫学，人民卫生出版社，1988，66。

[17] Ye, X. S. et al., Phytopathol., 1990, **80**:1295.

[18] 杜 杰等，生物工程学报，1988，**4**(2)：110。

[19] Wernsman, E. A., In CORESTA(ed)., CORESTA Inf Bull, CORESTA Symp Kallithea, Greece, 1990, 55.

[20] Caruso, F. L., Kuc, J., Physiol. Pathol., 1979, **14-15**:191.

[21] Cohen, Y., Kuc, J., Phytopathol., 1981, **71**:783.

[22] 刘西钊等，植物病理学报，1990，**20**(2)：123。

[23] Braun, J., Helton, A., Phytopathol., 1971, **61**:685.

[24] Muller, K., Borger, H., Arb. Biol. Vers Fortwi Berlin-Dahlem, 1940, **23**:189.

[25] Sutton, D., Austr Plant Pathol., 1979, **8**:4.

[26] Dong, H. S., Wang, Z. F., In CORESTA(ed) CORESTA Inf Bull, CORESTA Symp., Kallithea, Greece, 1990, 194.

[27] Kuc, J., In Key, J., Kosuge, T. (ed), Cellular and Molecular Biology of Plant Stress, Acan R Liss Inc, New York., 1985, 303.

[28] Collendavelle, J. et al., Physiol. Plant Pathol., 1982, **21**:271.

[29] Vance, C. P. ,Sherwood, R. T. , Phytopathol. , 1976,**66**:498.
[30] Collins, W. K. et al. , NC Agric Exp. Ser. , 1973, **108**:599.
[31] Hillochs, R. J. , J. Phytopathol. , 1986,**117**:216.
[32] Perombelon, M. C. M. ,In Mount. M. S. ,Lacy, G. H. (ed) Phytopathogenic Prokaryotes, Acad Press,New York;London, 1982, **2**:55.
[33] Salt, S. D. et al. , Phytopathol, 1988,**78**:733.
[34a] Kuc, J. , Rush, J. , Arch Biochem Biophy, 1985,**236**:455.
[34b] Kuc, J. , In Garry, I. C. ,Hoch H. C. (eds). The Fungal Sproe and Disease Initiation in Plants and Animals, Plenum Press,New York, 1992, 347.
[35] Guedes, M. E. M. et al. , Phytochem. , 1982, **21**:2987.
[36] Zook, M. ,Kuc, J. , In Paul, K. et al. (ed), The metabolism,Structure,and Function of Plant Lipids. Plenum Pub Co. , 1987, 75.
[37] Salt SD,Kuc J. Physiol Molecul Plant Pathol. , 1986,**28**:287.
[38] Van Loon, L. C. , Plant Mol. Biol. , 1985, **4**:111.
[39] Leach, J. E. et al. , Physiol. Plant Pathol. , 1983,**23**:377.
[40] Kauffman, S. et al. , EMBO J. , 1987, **6**:3209.
[41] Kombrink, E. et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA. , 1988, **85**:782.
[42] Tuzun, S. et al. , Phytopathol. , 1990,**80**:1032.
[43] Cornelissen, B. J. C. et al. , EMBO J. , 1986, **5**:37.
[44] Hooft Van Huijsduijnen, R. A. M. et al. , EMBO J. , 1986,**5**:2057.
[45] Somssich, I. E. et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986,**83**:2427.
[46] Pfizner, U. M. ,Goodman, H. M. , Necleic Acids Res. , 1987,**15**:4449.
[47] Tuzun, S. , Kuc, J. , Phytopathol. , 1985,**75**:783.
[48] 雷新云,中国农业科学,1987,**20**(2):1。
[49] Ahooumanesh, A. ,Shalle, T. A. , Plant Dis. , 1981, **65**:56.
[50] Kuc, J. , Preisisg, C. Mycologia, 1985, **76**:767.
[51] Tuzun, S. , Disser Univ of Kentucky,1986.
[52] Roberts, D. A. , Virology, 1982,**124**:161.
[53] 谈　文等,中国烟草学会编,中国烟草学会第二次会员代表大会会刊,1992;107。

INDUCED RESISTANCE AGAINST DISEASES IN PLANTS:MECHANISMS AND APPROACHES FOR DISEASE CONTROL

Dong Hansong

Induced resistance of plants to diseases is evidenced to take place following a special orderliness from genetic control to phenotypical expression. According to this orderliness,utilization of induced resistance can follow different ways and be expected to become an effective strategy for plant disease control.

From standpoints of plant-microbe interactions,the critical mechanism for induced resistance is that induction treatments make plants become incompatibility from original

compatibility in the interactions with pathogens. This process is acomplished by series of events. The genes for induced resistance are often called"latent genes" which need to be elicited or activated to express. When the genes are activated, they control special defense responses which act to counter pathogenicity by pathogens. The defense responses are phenotypically either histopathological or biochemical, including structural fortification such as lignification and paplla formation, elicitation and accumulation of phytoalexins, pathogenesis-related (PR) proteins and hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs), and mobilization of different enzyme systems such as peroxidates/peroxidases. At least researches on PR proteins and GRGPs and their genetics have proved that multigenes are involved enven for individual events of the above function elements. Plant pathologists are exploring function and regulation of these genes and expecting to obtain special and critical genes for use in genetic engineering of improving disease resistance in plants. The gene sources are not only of plants but also of microbes, such as genes for glucanases and β-1,3-chitinases.

Several approaches have been suggested for applying induced resistance to control plant diseases. Direct application of the inducers like avirulent or hypovirulent strains of pathogenic fungi has been practical, and direct application of elicitor compounds from the fungi or their host plants is more attractive. The ways to make induced resistance hereditable are taken through plant tissue culture and regeneration procedures, by which regenerated plants with enhanced resistance have been obtained in a few diseases such as tobacco brown spot (Part 4, this book). The way of genetic engineering to transfer the activated genes or related genes of other sources is dependent on at least two aspects: how well do we understand genetic and regulatory background of these genes? and what important roles in disease resistance are taken by the products of these genes?

植物抗病细胞工程：抗病细胞系的发生和定向筛选

卢培秀　董汉松

植物抗病细胞工程是指通过细胞或组织培养改造植物的抗病性，产生抗病再生植株并最终培育出抗病新品种的过程。新的抗病基因源的产生和原有抗病基因的易于改造，是细胞工程的两大优势：①原生质体融合（体细胞杂交，pH）可以改善植物种间杂交的不亲和性，使种间[1]、野生种[2]、甚至属间[3]抗病基因向作物栽培品种的引入成为可能，对雄性不育的利用尤其重要[4]；②在细胞或组织（双倍体体细胞）培养过程中发生的体细胞无性系变异（somaclonal variation，SV）包含可供选择的抗病性变异，而它可以与胁迫变异相加权而提高抗病性变异的程度和选择频率[5]；③配子体单克隆系变异（gametoclonal variation，GV）与SV有同样可以利用的基因变异，更重要的是作为单倍体育种的一种技术，可以对变异的基因在单倍体（一条染色体）和纯合的双倍体（dihaploid）上进行鉴定，不仅使隐性的变异基因得到选择，还可以通过加性变异（重复培养）汰除不良性状并强化目标性状[6]。

细胞工程对这些基因源的改造和利用包括抗病基因的选择或诱发它们在再生植株上表达及向后代遗传到品种化等一系列过程，在不同病害中已形成一整套技术。本文着重谈SV的发生、筛选和抗病性鉴定方面的研究情况，对pH的利用以及GV作为单倍体育种的基础等的研究进展，可看文献[7,8]。

一、细胞系变异的原因

自植物细胞的全能性获得证实以来，由细胞与组织培养产生再生植株的植物种类日益增多，同时证实培养过程中的细胞可以发生各种类型的遗传变异，包括染色体数目变化、结构畸变及基因突变[9-11]，其中突变频率高于植物体上通常发生的频率，而且突变性状可以稳定地遗传[12]。当以双倍体的体细胞为材料进行培养时，这种变异就称为细胞无性系变异（SV）；而发生在单倍体的配子体（如花药）细胞系培养过程中的变异则被称为配子体单克隆系变异（GV）。在许多研究中，施加不同因子处理既可增加SV和GV的频率和程度，又可诱发新的变异。

1. 自发变异

SV在多种作物[9,10,12-14]上都有发生，而且由多种外植体如愈伤组织、原生质体、胚细胞及分生组织，经培养都可得到各类变异体[15]。Flick 1983年曾作过统计，在由离体培养得到的突变体中，有56%是自发突变，另44%是经诱变处理得到的。

有人认为通过组织培养得来的变异与有性繁殖产生的变异没有什么不同[16]，但许多研究者发现组织培养产生的变异类型远多于有性繁殖过程的变异类型[17,18]。变异可以发

生在单基因控制的性状上，也可以发生在多基因控制的性状上[19-21]；并可同时发生在胞质基因和核基因控制的性状上，变异类型有染色体数目变化、染色体易位、缺失、倒位等结构变化及点突变[9,10]。这些 SV 类型产生的原因尚未清楚，但普遍认为组织培养用的激素如 2，4-D、细胞分裂素既可以导致染色体数目变化，也可使染色体畸变[11]；也有人认为变异部分是来自外植体细胞中早已存在的突变[10,22]。

2. 诱发变异

诱变处理通常可以提高材料的变异率，一般比未经诱变处理的细胞群高几倍到几十倍（表 1）；通过诱变处理还能获得在自发变异中极难产生的新的变异[23]。诱变因子的种类依材料及选择目的而不同。在常用的诱变因子中，物理诱变因素有 X 射线、γ 射线、紫外线和中子辐射等，化学诱变因素有甲基磺乙酯（EMS）、亚硝基乙基脲（NEH）、N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍（NG）、亚硝基甲基脲烷（NMU）、叠氮化钠（NaN_3）和乙烯亚胺（EI）等。近年来，中国生产的平阳霉素被认为是一种有效的强诱变剂，诱发蚕豆根尖染色体畸变频率比 EMS[24]与 EI[25]都好。但在诱发植物细胞突变方面尚未见报道。

表 1　植物培养细胞的突变频率[23]

Table 1　Mutation frequency in tissue culture

体系	诱变处理	选择目的	突变频率		物　种
			自　发	诱　发	
悬浮培养细胞	EMS	抗放线菌酮	5.4×10^{-8}	7.7×10^{-7}	胡萝卜
	NG	抗放线菌酮	5.4×10^{-8}	4.4×10^{-7}	胡萝卜
	NG	抗 H_gCl_2	2.7×10^{-7}	10^{-6}～10^{-7}	矮牵牛
	NEH	抗氯酸盐	6.6×10^{-8}	2×10^{-7}	烟草
	NMU	抗 NaCl	$3\times10^{-6}-4\times10^{-6}$	$3\times10^{-5}-4\times10^{-5}$	野生烟草
原生质体	X 射线	色素改变	10^{-5}	4×10^{-4}	南洋金花
	NG	色素改变		2×10^{-4}	南洋金花
	紫外线	抗缬氨酸	2.2×10^{-5}	1.4×10^{-5}	烟草

二、抗病细胞系的定向选择

无论是自发的 SV 变异还是 SV 产生过程中诱发的变异，都包含抗病性的变异类型[15]。抗病性定向选择是以细胞系或它的再生植株及其后代对病原物或致病因子的反应表型为依据筛选抗病性强的细胞系或植株个体，同时包括对不良变异的汰除。

1. 胁迫选择

这是指在细胞系产生过程中施加病原物因素增强变异而获得抗病细胞系的过程，而从细胞系到再生植株，因植物和病害的不同，可以用病原物直接接种或其致病分子处理而进行抗病性鉴定[26]。

（1）病原物直接用作筛选因子：对离体培养的细胞群体接种病原物，是选择抗病突变

体最直接的途径，但目前很少应用，主要原因有二：一是对离体细胞处理难以一致，如Harrison[27]报道，在健康愈伤组织上或培养细胞上接种病毒，接种率最高达90%左右，而病原真菌、细菌也不可能均匀地侵染愈伤组织的每个细胞；二是胁迫处理梯度不好控制，容易把全部细胞杀死；有的甚至是抗病品种的组织在培养中也有病原物生长[28]。

为克服接种不全面的缺点，Shepard[29]在研究烟草抗马铃薯X病毒(PVX)时，首先进行体内接种，然后从系统感染PVX病毒的烟草植株上取外植体进行组织培养，获得了4 000株再生烟苗，经测定大约有8%的植株体内不含PVX病毒粒体，但仅有一株对PVX表现抗性，表明病毒侵染并不能有效地诱发植株的抗病性。Murakish等[30]在研究烟草抗烟草普通花叶病毒(TMV)的黄化株系时，预先使烟苗在高温、高湿、黑暗条件下长成黄化苗，然后接种病毒，待系统侵染后用γ射线照射处理烟苗，从该处理过的植株上取材料，通过组织培养得到了7棵抗TMV黄化株系的再生株，抗病性表现为限制病毒在体内的增殖和扩展速度，显症推迟3—8周，而且抗病性可以遗传。在此法中，物理诱变的作用主要被用于加强抗病毒突变或增加它的频率(加权性)。

在植物真菌和细菌病害中，用病原物作为筛选因子的许多研究结果不一。Sacristan[31,32]用*Phoma lingam*及*Plasmodiophora brassicae*的孢子处理寄主小油菜的愈伤组织，不能筛选出抗病突变系。但Pullman和Rappapor[14]用*Fusarium oxysporum* f. sp. *apii*成功地筛选出了芹菜抗病突变体，但并未弄清在选择过程中起主导作用的是病原物本身还是其代谢产物(毒素)。Prasad[33]等从系统感染霜霉病菌(*Sclerospora graminicola*)的谷子幼花序上取材料，经组织培养也筛选出了抗霜霉病的再生株。这些研究说明，病原物是可以用来作为筛选因子的，但依病害种类而变化。

(2)以病原物毒素及类似物作为筛选因子： 病原物毒素作为抗病性筛选因子的作用依赖于它作为致病因子或感染诱导因子的作用：对毒素的抗性与对病原物侵染(病害)的抗性相一致。以毒素代替病原物作为筛选因子有许多优点：首先，很容易把病原物与植物组织(细胞)分开培养；其次，毒素易于传导，可均匀地分散在培养基或培养液内，并可以控制选择浓度。许多研究者用毒素筛选都成功地获得了抗病的再生株(表2)，而且抗病性是可遗传的。

类毒素化合物有与毒素相同或相似的结构基团，可以代替毒素作为选择因子选出毒素突变体。如Carlson[44]用与烟草野火病菌*Pseudomonas tabaci*毒素结构相似的化合物蛋氨酸磺基肟(methionine sulfoximine)为选择因子，从经过甲基磺酸乙酯(EMS)诱变处理的单倍体烟草细胞中筛选出了抗野火病的突变体，抗病性可通过二倍体再生植株遗传给后代。

根据毒素专家Yoder(1982)的意见，用致病毒素选择法能够选择出高抗病水平的突变体[45]，但需要几个条件。首先，为确保用毒素筛选出的抗毒素外植体的再生植株具有抗病性，在使用毒素前，必须搞清楚毒素在病程中的作用，即毒素是否引起典型症状。其次，需弄清病原物在寄主体内外产生的毒素是否一致。能产生毒素的病原物(包括真菌、细菌)有100多种，产生寄主专化性的毒素很少，而且有些毒素在病程中的作用尚不明了，这必然限制了用毒素选择抗病突变体的范围。有的毒素如尾孢素(cercosporine)尽管在病害中起着主导作用，但用它很难筛选出抗毒素细胞系。尾孢素是一光敏型毒素，可被光活化产生游离氧及超氧化物[46]，氧化细胞膜上的不饱和脂肪酸，改变膜流动性引起膜渗漏[47]，

导致细胞死亡，目前无论使用何种起始材料及是否诱变，都未分离出抗毒素突变系。

表 2 以毒素及其类似物为筛选因子获得抗病性突变体的例子

Table 2 Examples of resistant mutants produced by toxin stress cultures

寄 主	病原物	毒 素	抗 性		遗传性	参考文献
			细胞水平	再生株		
玉米	*Helminthosporium maydis* race T	HMT-toxin	+	+	+	[34]
马铃薯	*Phytophthora infestans*	培养滤液	+	+	未测	[35]
马铃薯	*Fusarium oxysporum*	培养滤液	+	未测	未测	[36]
油菜	*Phoma lingam*	培养滤液	+	+	+	[31,32]
烟草	*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*	半提纯	+	+	+	[37]
烟草	*Phytophthora parasitica* var. *micotianae*	培养滤液	+	+	+	[38,39]
甘蔗	*Helminthosporium sacchari*	半提纯	+	+	+	[40]
苜蓿	*Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*	培养滤液	+	+	+	[41]
菜豆	*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*	phaseo-lotoxin	+	+	+	[42]
莴苣	*Sclerotinia* spp.	草酸	+	−	−	[43]
烟草	*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*	蛋氨酸磺基肟	+	+	+	[44]

2. 非胁迫选择

由于并非所有的病原物都可产生特异毒素以及病原物作为筛选因子的种种限制，非胁迫选择就成为筛选抗病突变体的另一种方法，而且有不少成功的例子(表 3)。这种方法的依据是体细胞无性系变系的多向性和可遗传性。有些研究表明，非胁迫选择与用毒素或病原物胁迫选择的结果无差异[13,31,34,41]。利用该方法最成功的例子是在甘蔗抗病育种上[50]，从高感菲基(Fifi)病毒病的"Pindar"品种，经培养选育出了抗病且高产优质的"Ono"栽培品种，已应用于生产实践。

非胁迫选择法有许多优点。离体培养的细胞本身可以发生高频率的突变，对获得突变体显然是一个有利的条件。用病原物或毒素筛选抗病突变体并非适用于所有的病害，且需首先明确病原物与寄主的关系、毒素的作用及胁迫条件等，而直接对再生株作抗病性选择就无需关心这些问题，也不必研究细胞水平与整株水平抗性是否有差异。

抗性鉴定工作量大，难于筛选抗病突变株是该非胁迫选择法一个主要的缺点。当施用

胁迫因子时，在细胞水平可进行定向初步选择，一般抗毒素的突变细胞系，其再生株抗病可能性要大。而在成株期筛选抗病突变体，工作量大并且有时劳而无功。如Carlson[15]曾从高感锈病的甘蔗品种B_{4362}培养出70 000株再生苗也未筛选出一株有抗病性者。与此相似，有从甘蔗6个高感黑粉病的品种诱发再生植株30 000棵，也未筛选出一株抗病性较好的突变体。

表3 在无胁迫条件下获得抗病变异系的实例

Table 3 Examples of production of resistance smaclones in no-stress tissue cultures

寄主	起始材料	所抗病原物或病害	遗传性	参考文献
苜蓿	愈伤组织	*Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*	+	[41]
苜蓿	叶肉原生质体	*Verticillum albo-atrum*	未测	[48]
芹菜	悬浮细胞	*Fusarium oxysporum* f. sp. *apii*	未测	[13、14]
		Cercospora apii	未测	
		Septoria apiicola	未测	
		Pseudomonas cichorii	未测	
		Fusarium oxysporum f. sp. *apii*	未测	
油菜	愈伤组织	*Phoma lingam*	+	31、32
玉米	愈伤组织	*Helminthosporium maydis* race T and Hmt	母体遗传	[34]
马铃薯	叶肉原生质体	*Alternaria solani* and *A. solani* toxin	+	[49]
马铃薯	叶肉原生质体	*Phytopththora infestans*	+	[21]
甘蔗	愈伤组织	Fiji disease	+	[50]
甘蔗	愈伤组织	*Sclerospora sacchari*	未测	[51]
甘蔗	愈伤组织	*Helminthosporium sacchari* and HS-toxin	+	[51]
甘蔗	愈伤组织	*Puccinia melacephala*	未测	[52]
烟草	愈伤组织	*Peronospora tabacina*	+	[53]
烟草	叶肉原生质体	*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*	未测	[15]
番茄	愈伤组织	*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*	+(单基因控制)	[20]

三、几点评述

1. 关于待改良品种的选择

材料的遗传背景是突变发生的基础，人们不必期望通过组织培养会有奇迹出现，以为从各方面性状都很差的品种经处理就能选出优质高产抗病的突变系。应从所能得到的最好的品种入手。如在抗病性筛选中，选用的品种应该具备其他方面的优良性状，要改造的只有抗病性。

2. 关于起始材料的选择

目前已使用或可以使用的高等植物材料有：从体细胞培养的愈伤组织（双倍体）、从幼

胚培养的双倍体愈伤组织，从花药培养产生的单倍体愈伤组织或单倍体的细胞悬浮液、花粉粒悬浮细胞，以及单倍体或双倍体的原生质体悬浮细胞等。单倍体起始材料具有许多优点：无论是隐性或显性性状都能在单倍体水平上表现出来，易于选出抗病突变系。有研究表明，单倍体材料的基因变异一般发生在核染色体上，这就保证了变异的遗传稳定性。液体培养的单倍体细胞和原生质体是很好的起始材料，但其再生能力远远不如愈伤组织，而且目前仅对极少数植物的细胞能继代培养并诱导产生再生株。

3. 细胞突变的不可期性

细胞突变常常是多个性状同时发生改变，这势必为育种工作带来许多不利。Bidney[54]曾对马铃薯 63 个突变体分析其 26 个性状，发现有一个突变株 17 个性状发生了改变，只有 3 个突变株只改变了一个性状。在许多研究中都曾发现，抗病性提高的突变株其农艺性状却变得不理想。对抗病性和其他性状同时进行改良，已成为对抗病育种的基本要求，对此可看文献[7,8]。

参 考 文 献

[1] Fehr, W. , R. , Principles of Cultivar Development, Vol 2. Crop Species, Mac Millan Pub. Co. , New York, 1987, 669－698.

[2] Chun, J. J. et al. , CORESTA Inr Bull. , CORESTA Symp. Greece, 1990, 136.

[3] Smeeton, B. W. et al. , CORESTA Inf. Bull. , CORESTA Symp. Greece, 1990, 179.

[4] Delon, R. , CORESTA Inf. Bull. , CORESTA Symp. , Greece, 1990, 180.

[5] Amin-Genedy, C. et al. , CORESTA Inf. Bull. , CORESTA Symp. Greece, 1990, 171.

[6] Depaepe, R. et al. , Plant Sci. Lett. , 1982, **28**: 11－28.

[7] Wernsman, E. A. , CORESTA Inf. Bull. , CORESTA Symp. , Greece, 1990, 55－84.

[8] 董汉松等，烟草学刊，1991，**2**：9－22.

[9] Zing-Xiu, S. et al. , Theor. Appl. Genet. , 1983, **67**: 67－73.

[10] Orton, T. J. , Adv. Plant Pathol. , 1984, **2**: 153－189.

[11] Kallak, H. I. , et al. Mutat. Res. , 1985, **147**: 51－57.

[12] Larkin, P. J. , et al. , Theor. Appl. Genet. , 1981, **60**: 197－214.

[13] Pullman, G. S. et al. , Phytopathol. , 1983, **73**: 818.

[14] Wright, J. C. , Phytopathol. , 1985, **75**: 967.

[15] Daub, M. E. , Annu. Rev. Phytopathol. 1986, **14**: 159－186.

[16] Sanford, J. C. , Euphytica, 1984, **33**: 709－715.

[17] Dixon, L. K. et al. , Theor. Appl. Genet. , 1982, **67**: 75－80.

[18] Moyer, J. W. et al. , Hortscience, 1983, **18**: 11－12.

[19] Evans, D. A. et al. , Science, 1983, **221**: 949－951.

[20] Evans, D. A. et al. , Am. J. Bot. , 1984, **71**: 759－774.

[21] Shepard, J. F. , Annu. Rev. Phytopathol. , 1981, **19**: 145－166.

[22] Lorz, H. et al. , Theor. Appl. Genet. , 1983, **66**: 67－75.

[23] 胡含等主编，植物体细胞遗传与作物改良，北京大学出版社，1988，268－286。

[24] 谷爱秋等，中国科学院遗传研究所工作年报(1980)，1981，131－132。

[25] 王钦南等，中国科学院遗传研究所工作年报(1980)，1981，130。

[26] Ishia, Y. et al. , Plant Disease, 1988, **72**: 892－895.

[27] Harrison,G. G. et al. ,Phytopathol. , 1983,**73**:67-137.
[28] Chen,W. H. et al. ,4th Intern. Conger. Plant Tissue and Cell Culture,Abstr. 1978,1502.
[29] Shepard,J. F. , Virology,1975,**66**:492—502.
[30] Murakishi,H. H. ,Plant Cell Rep. ,1982,**1**:92—97.
[31] Sacristan,M. D. ,Theor. Appl. Genet. ,1982,**61**:193—200.
[32] Sacristan,M. D. ,Hereaitas Suppl. , 1985,**3**:57—63.
[33] Prasad,B. et al. ,Curr,Sci. ,1984,**53**:816—817.
[34] Brettell,R. I. S. et al. ,Theor. Apple. Genet. ,1980,**58**:55—58.
[35] Behnke,M. ,Theor. Appl Genet. ,1980,**56**:151—152.
[36] Behnke,M. ,Z. Pflanzenzuecht,1980,**85**:254—258.
[37] Thanutong,P. et al. ,Theor. Appl. Genet. ,1983,**66**:209—215.
[38] 周嘉平等,烟草学刊,1990,**2**:17—25。
[39] 周俭民等,烟草学刊,1990,**2**:59—67。
[40] Larkin,P. J. et al. ,Plant Cell Tissue Organ Cult. ,1983,**2**:111—122.
[41] Hartman,C. L. et al. ,Plant Sci. Lett. , 1984,**34**:183—194.
[42] Gantotti,B. V. et al. ,Phytopathol. ,1985,**75**:1316—1317.
[43] Zngler,D. E. et al. ,Phytopathol. ,1982,**72**:1003.
[44] Carlson,P. S. ,Science,1973,**180**:1366—1368.
[45] Yoder,O. C. ,Annu. Rev. Phytopathol. ,1980,**18**:103—129.
[46] Daub,M. E. ,Phytopathol. ,1982,**72**:370—374.
[47] Daub. M. E. ,Plant Physiol. ,1983,**71**:763—766.
[48] Latunde-Dada,A. O. et al. ,Plant Sci Lett. ,1983,**32**:205—212.
[49] Materm,U. et al. Proc. Notl. Acad. Sci. USA,1974,**75**:4935—4939.
[50] Krishnamurthi,M. et al. Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol. ,1974,**15**:130—137.
[51] Liu,M. C. et al. ,4th Intern. Conger. Plant Tissue and Cell Culture,Calgary,Canada,1978,163.
[52] Liu,L. J. et al. ,Phytopathol. ,1983,**73**:797.
[53] Zagorska,N. et al. ,See Ref. 1,1985,74:371.
[54] Bidney,D. L. et al. ,Biotechnol. Bioeng. ,1981,**23**:2691—2701.

CELLULAR ENGINEERING FOR DISEASE RESISTANCE IN PLANTS:ELICITATION AND SELECTION OF RESISTANT SOMACLONES

Lu Peixiu and Dong Hansong

Plant cellular engineering has been proved to be an effective technology for plant breeding of disease resistance. It usually indicates the procedure of obtaining new cultivars with improved disease-resistance through three techniques. The first one is somatic hybridization which can make successful inter-species and even inter-genus hybridization of plant germplasms. The second technique is somaclonal variation(SV) which acts as a main source of genetic change and gene increase without gene introduction or addition. The third one,gametoclonal variation,occurs through haploids;it can produce additive,

controllable and stable genetic variations, and can accomplish expression of mutation in the recessive loci of genes and combinated expressions of mutations in multigenes. Especially, the procedure of haploid doubling has been used as a successful and highly effective breeding strategy, called haploid breeding. There are a great deal of successful samples of breeding for enhancing plant resistance to diseases by the plant genetic engineering.

The SV can take place spontaneously without exerting any stress factor, and is attempted to use as a way to make induced resistance phenotypically hereditable, where the original plants to follow the SV procedures are in advance induced by different factors (called inducers). It is expected that the genetic variation in tissue or cell culture cause alternation of conidioning heredity of genes in the induced plants, which is an effect of combination of SV with activation of the usually called "latent genes" for induced resistance. From this idea, and in our laboratory, two tobacco somaclones with enhanced resistance to brown spot have been obtained from the cv NC89 which had been induced respectively by two viruses before entering the SV process (See related papers in Part 4).

Gene mutations are frequently elicited by different chemicals. For this, some examples in different diseases are introduced.

The common procedures for plant genetic engineering are from tissue cultures to production of regenerants. When improving disease resistance is taken as target, and then the resistance has been enhanced, the regenerants and their progenies are called resistant somaclones. Resistance degree of the somaclones can be identified by inoculating pathogens or their toxins at different stages from tissue cultures to regenerants, depending on diseases.

Comments are given in the last part of this paper: what kinds of plant cvs should be used for improving disease resistance? what kinds of plant materials (haploid or diploid) are satisfactory to be initiative in the tissue culture? and how to control the unexpected variation?

烟草侵染性病害防治面临的困境与对策

董汉松　王智发

烟草各种侵染性病害的发生，严重影响我国烟草产量和质量，而目前的防治措施由于其本身的局限性和各种条件的限制，一直未能获得明显效果。诱导抗性的非专化性及其利用的多途径性，可望提供一项高效性、多抗性、无公害的治理对策，并由此建立一套用于烟草侵染性病害防治的技术措施。这一对策和措施在其他作物病害防治中有广泛的应用前景，目前仍需多方面的研究（本文写成于1988年，英文摘要是新加的）。

一、烟草侵染性病害发生和防治现状

长期以来，烟草各种侵染性病害严重发生，极大地影响了烟草产量和烟叶质量。烟草赤星病等叶斑型病害在全国各烟区发生普遍，尤其在采收中后期叶面与茎秆发病率达80—90%，曾一度使烤烟均价下降1—2个等级[1]。低头黑病在山东省某些烟区生长前期发病率即达70%，发病严重时烟株死亡，造成部分绝产[1]。黑胫病是另一种全国性真菌病害，从70年代开始在黄淮烟区趋于回升，1981年仅山东安丘一县就因此病绝产一万亩[1,2]。以普通花叶病和马铃薯Y病毒病为主的病毒病害在全国各烟区常年发病株率达90—100%，造成的产量损失可达50—70%[1]。青枯病在长江以南烟区发病株率为50—60%不等，减产40—50%。角斑与野火病在山东、辽宁、云南等重病区发病率常年达60—70%，1987年山东省青州市郑母镇，暴雨后5 000多亩烟田爆发野火病，使烟叶失去经济价值[1]。根结线虫等引起的线虫性病害发病率一般为70—100%，减产30—70%。

可见，烟病防治直接影响着我国烟草的发展。目前采用的防治措施由于其本身的局限性和各种条件的限制，一直未能获得明显的效果。

1. 抗病育种

目前推广的品种对以上主要病害很少是高抗、耐病或免疫的[1]。由于烟草对大多数侵染性病害的抗性是受水平抗性基因或多基因的遗传控制，并不一般地符合基因对基因学说[3]。因此，传统育种法很难筛选出高抗基因，而且也难以克服抗病性和产量、质量性状的矛盾。此外，抗病育种需时较长，也是不能尽快满足防病需要的原因之一。

2. 化学防治

局限性有4方面：某种药剂只能控制某种病害在烟草某一生长期的发生；对病毒与细菌性病害，尚无有效药剂可用；残毒问题；使用抗生素防治细菌性病害对农业、临床医学及其他生态的极大的潜在危险。细菌对农用链霉素之类抗生素很容易产生抗药性，抗药性的控制基因多由细菌的染色体外基因载体-质粒携带，而质粒可以很高的概率（$10^{-7}-10^{-6}$/

菌体)在同种和不同种的细菌间传递[4a]，从而引起抗药性的高概率传播。同时，由于农业生态系统难以像临床医学一样实施良好的灭菌条件，因而由抗生素施用于农作物所导致的抗药性传播，就更有其广泛性和危险性。

3. 农业措施

烟病的农业治理除了必须贯穿于烟草生长期管理(水、肥等)和生长间期(病残体的处理)管理外，还必须注意烟草生产所特有的生理性管理(打顶、抹杈)以及烘烤和贮存过程(可发生细菌性腐烂病)。这涉及从烟农到不同专业科技工作者不同层次的人员，在我国现阶段会有许多实际困难，许多侵染性病害借农事操作而传染就说明了这个问题。虫传性病毒病的农业防治还要涉及有关害虫的治理。此外，土传和气传病害是目前国内外农业措施难以控制的。

二、病害控制对策

鉴于上述，一项高效的、无公害的烟草侵染性病害控制对策及其可行性研究，已成为我国烟病防治中亟待开展的课题。关于诱导抗性的研究，已为这种对策的建立及有关技术措施的探讨，提供了可行性。

诱导抗性现象的研究已有近 70 年历史，而将诱导抗性的利用作为一种病害控制对策来研究国外是从 70 年代末开始的。诱导抗性的机制是：植物对侵染性病害的抗感表现，不仅决定于抗病基因的存在与否，还取决于这种基因表达的程度与幅度，而抗病性表达的程度与幅度可由一定的因子诱导而加强[5,6]。诱导抗性具有以下 5 方面的特征。

1. 进化论基础

植物体内存在着可以抵抗所有侵染性因子的基因，其中某些基因在寄主与病原物共同进化[7]的自然状态(一定阶段)下能够表达，是植物的先天(固有)抗性基因。而另一些基因由于病原物与寄主共同进化所形成的平衡制约关系[7]，因而在通常情况下不能或不能完全表达，受诱导后植物便处于一种"敏感化"状态[8]。"敏感化"状态下的植物当受病原物侵染时，这些基因便得到表达[5,8-10]而表现对病害的抗性，这种抗性就是诱导抗性。因此，诱导抗性是植物的一种后天免疫，是通过调控和改造病原物-寄主植物互作[11]而实现的对植物内在抗性机制的开掘，要打破由病原物与寄主共同进化所形成的平衡制约关系，才能使这种关系向有利于寄主抗病性的方向发展(例证见文献[12])。

2. 广泛的诱导因子来源

诱导抗性验证的基本方法是在接种病原物(强毒株)之前预接种诱导因子。诱导因子包括病原物的弱(无)毒株、病毒粒体、非病原菌(真菌和细菌)和某种物理化学因子[9,13]。病原菌弱(无)毒株可作为病原与寄主互作的一方，而影响互作的内系统[7,14]，被认为是一类理想的诱导因子。

3. 诱导抗性的表现

诱导抗性表现为侵染性病害的减轻，机制之一是某种抗病性物质在植物体内的诱导

合成[2,15]；某些因子诱导的烟草抗病性可通过种子遗传给后代植株[8]。

4. 诱导抗性的非专化性

表现为烟草对某种病害的抗性可由多种因子加以诱导，单一因子诱导的烟草抗病性可以抵抗多种侵染性病害的为害，对烟草作单因子诱导，可使烟草对至少 12 种病害产生系统抗性[9]。

5. 无公害

由于诱导抗性是通过植物的后天免疫实现的，诱导因子可以不必与病原物同时作用于植物（与其他生防的主要不同点），因而可以避免可能出现的致病新类群和环境污染等潜在为害。

从病害控制的生态学来看，诱导抗性的利用是由调控作物生态控制病害发生发展，转变为开发植物内在抗性机制防治病害的一项新策略。在病害控制学上的优势是，将病害控制对策由病原-寄主互作的外系统[7,14]转向互作的内系统，可增加可控性，这是现代植病防治的一条重要途径。Kuc（1985）指出，它应该作为农业无公害治理的一项重要对策，与农业害虫防治、大气和土壤污染的清除相平行，被予以实施[5]。基于烟草侵染性病害发生、为害的严重性和目前的防治情况，烟草侵染性病害控制的新对策是：开拓国内外植病防治领域中高效性、多抗性和无公害治理的新路线，建立一套以利用诱导抗性为途径的烟草侵染性病害防治的技术措施。

三、研究现状与应用前景

目前国外对诱导抗性的研究，在诱导因子方面涉及真菌、细菌和病毒及水杨酸钠等化学因子和射线处理等物理因子[5,9,10,12,16—18]，诱导的植物包括麦类[19]、豆类[17]、马铃薯[20]及瓜类[11]等多种作物，大量研究是在烟草病毒病和霜霉病上进行的；利用不同学科的研究手段[5,6,8]就抗性诱导对病原-寄主互作的胁迫作用[10]、诱导抗性的信号传递[21,22]、b 蛋白的产生及其他生化反应[5,23]以及作为非诱导因子的生物与非生物因素对诱导抗性的影响[6]等多方面，进行了系统探讨。这一方面表明诱导抗性研究在多个学科都有广泛涉及面，另一方面为寻找利用诱导抗性防治作物病害的途径提供依据。应用措施的建立和生产上的实施，还有待于对利用途径作更多的研究。国内关于诱导抗性的研究一直很薄弱，只有一些零星的试验报道，在烟草上还是空白。但国际有关研究进展和国内种种条件，仍使我们提出的烟病控制对策有其施行研究的基础。

首先，诱导抗性的 5 个特征可以允许在不同试验水平上研究其利用途径[2,15]。这些途径是：①利用诱导抗性的遗传性，获得并使用含可遗传诱导抗病性的种子；②利用诱导后烟草产生的抗病物质，开创“植物抗生素”的另一条途径（大蒜素是固有植物抗生素）；③诱导因子直接应用（以不导致公害为前提）；④通过组织培养将诱导抗性转移到再生植株上，以无性繁殖栽培技术用于病害防治；⑤借遗传操纵将诱导抗性基因引入高产、优质的烟草品种中，同时解决抗病性和产量、质量性状问题。

第二，我国烟草产业三位一体的管理形式，为该类研究在全国范围内进行必需的协

作,提供了方便。

第三,国内已有初步的研究基础。董汉松等的研究表明,赤星病菌弱毒株和某些非病原细菌可诱导烟草对赤星病的50—70%的保护作用,并证明赤星病菌致病力在人工接种条件下表现稳定,这就提出了弱毒菌株直接应用的可能;同时经研究建立了一套诱导抗性鉴定及有关方法[14,15],在诱导抗性的利用途径方面也开始了研究。

在以上基础上,以诱导抗性的非专化性和利用的多途径特性为依据,这项烟病控制对策的应用前景表现在以下3方面:①诱导抗性利用的多途径特性,允许通过多种措施和相应技术将上述烟病控制对策用于烟病防治;②诱导抗性的非专业性,允许多抗性诱导因子谱的建立及其在不同生态条件的烟区加以应用;③允许以利用诱导抗性为途径的侵染性病害控制对策推广到所有作物病害的防治中。

最后,有两个相对的方面必须指出:一是任何防病措施都是以不引起病原物-寄主-环境功能系统的失调才是有效的。有目的的植病生物防治在本世纪20—40年代兴起之后,由于对病害土壤生态学缺乏了解,使这项技术在40—60年代在大田应用中屡遭失败。这一方面使生物防治受到冷落,同时导致了化学防治的滥用造成的残毒和公害问题。70年代初用K84菌株防治树木冠瘿病在大田取得巨大成功[4b],极大地推动了植病生物防治的研究和应用。从70年代中后期开始,由于生物工程在植病领域的应用,以及80年代初诱导抗性的利用作为防病对策的研究,使传统的"以菌治菌"的生物防治技术再受冷落。同时,有关专家指出,大量"生物性因子(生防菌)"向作物生态的投入,可能会导致病原物-寄主共同进化关系的失调和新的公害。在国内,60年代前后尹莘耘等5406"生物肥料"的大面积推广,使我国植病生物防治第一次兴起[24],也是由于多种原因造成的滥用而受到冷落。自80年代中期,陈延熙等[19]对增产菌、王金生和方中达等对莱丰宁的研究和推广应用,首次在国内实现了有目的的利用微生物间的相互制约关系控制植物病害的策略,形成了我国植病界的"生物防治热",这与K84防治冠瘿病的成功推动了世界植病生物防治研究的情况很相似,在这种情况下提出诱导抗性作为病害防治的对策,显然是及时的和必要的。因为以上情况说明,单一措施的"热潮"是很难持久的。二是诱导抗性的利用本身必须作为病原物-寄主植物互作的一种形式或状态加以了解。Dean和Kuc(1985)指出,诱导抗性现象与病原物-寄主的相互识别[14]和植物保卫机制的活化有关,抗性诱导可以增强病原菌的非自身识别,或同时加强寄主抗病反应的强度和快速反应的能力。这种作用只是病原物-寄主互作的一种方式;同时,由于从理论和生产实践两方面看,现代植病防治对策无一不是对病原物-寄主植物互作的调控、改造和利用,因而以诱导抗性的利用为途径的烟草(植物)侵染性病害控制对策,只是现代植(烟)病控制策略的一种或其发展阶段。

参 考 文 献

[1] 陈瑞泰、王智发等,烟草病虫害防治,山东科学技术出版社,1989。

[2] 王智发、刘延荣等,植物保护学报,1985,**12**(1):51—55。

[3] Van der plank,J. E. ,Priniples of Plant Infection Academic, Press,New York,1975.

[4a] Hardy,K. G. ,Bacterial Phasmids. Thomas Nelson and Sons,Ltd. , 1981.

[4b] Kerr,A. J. , Appl. Bacteriol. ,1972,**35**:493—497.

[5] Kuc,J. ,Inf. Bull. 9th Intern. Tob. Sci. Congr. Guangzhou,China,CORESTA,1988,24—43.

[6] Preisig, C. L. and Kuc, J., Plant Physiol., 1987, **84**: 891—894.
[7] Robinson, R. A., Plant Pathosystem, Springer-Verlag, Berlin, 1976.
[8] Dean, R. A. and Kuc, J., Phyisiol Molec. Plant Pathol., 1987, **31**: 69—81.
[9] Kuc, J., Biosci., 1982, **32**: 854—860.
[10] Kuc, J. and Preisig, C., Mydologia, 1984, **76**: 767—784.
[11] Linppincott, J. A. and Linppincott, B. B., In Plant-Microbe Interactions, Molecular and Genetic Perspectives, Vol. 1 (Nester, E. W., ed.), MPC, New York; CMP, London, 1984, 159—214.
[12] Sequeira, L., In Plant Disease Control (Steples, R. C. and Toenniessen, G. H., eds.). Wiley, Chichester, 1981, 143—153.
[13] Elliott, D. C. and Skinner, J. D., Phytochem., 1986: 25, 39—44.
[14] 董汉松，博士研究生学位论文，南京农业大学，1988。
[15] 董汉松、王智发，山东农业大学学报，1989，**20**: 1—8。
[16] Dean, R. A. and Kuc, J., Trends Biote. Chnol., 1985, **3**, 125—129.
[17] Tuzun, S. and Kuc, J., Phytopathol., 1987, **77**: 1032—1035.
[18] Wilson, C. L. et al., Phytopathol., 1987, **77**: 303—305.
[19] 陈延熙等，生物防治通讯，1985(1): 22—23。
[20] Zook, M. N. and Kuc, J., Phytopathol., 1987, **77**: 1217—1220.
[21] Dean, R. A. and Kuc, J., Phyisiol. Molec. Plant Pathol., 1986, **28**: 227—233.
[22] Dean, R. A. and Kuc, J., Phytopathol., 1986, **76**: 967—970.
[23] Tuzun, S. et al., Phytopathol., 1989, **79**: 979—987.
[24] 尹莘耘等，微生物学报，1965，**11**: 259—288。

DIFFICULTIES AND STRATEGIES IN CONTROLLING INFECTIONS DISEASES OF TOBACCO

Dong Hansong and Wang Zhifa

A recent investigation on infectious diseases of tobacco in China first presented systematic information about species and pathogens, epidemics, loss estimation of output and output value, and management situations of tobacco diseases in the country. Of 68 diseases, brown spot, complex virus-causing diseases, blackleg, and root knot are among the serious ones, causing total output loss of about 2×10^7kg every year. Especially, brown spot caused by *Alternaria alternata* and necrotic diseases by viruses are increasingly epidemic in both areas and disease severities in the last 15 years. The limitations and difficulties faced by the disease control practice are because of the facts in the country as follows: ① the vast tobacco-planted areas with various climates provide suitable conditions for each individual diseases; ②the concrete difficulties and incompeteness in the agricultural management cause accumulation of pathogen sources; ③ lack of natively suitable cultivars has tobacco production be dependent on import cvs such as NC89 and NC82 which show inadaptability to the local conditions and susceptibility to the major diseases although they are excellent in both agronomy and disease resistance when they

are planted in their native country, and ④ conflicts of chemical control with quality requirement of the cured leaves and safe requirement by public are increasingly awoke and paid more attentions, at least in the scientific and technical fields.

The strategies for tobacco disease control are suggested to be application of induced resistance. The advantages, feasibility and outline approaches are talked about in this paper.

根据植物-病原物互作控制烟草赤星病的途径

董汉松　卢培秀　杨合同

烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)主要靠孢子在广泛的空间传播,存在明显的地理分化[1,2],这使烟草赤星病既成为世界范围内的侵染性病害,同时也使它在不同烟区经历了不同的消长变化[3]。最近15年内,它在美国等世界主要产烟国家逐渐成为次要病害[4],但在中国烟区为害渐重,成为主要的叶部病害[3]。本文对其中的原因作了分析,提出从寄主-病原物互作出发研究病害控制的新途径,并总结了对这些途径探讨研究的进展。

一、病害发生和控制状况

病害流行是在寄主生长的大范围内的环境条件下寄主-病原物群体互作的结果。由这种群体互作导致的赤星病的发生程度可以由病原真菌在不同地理、生态环境和寄主群体条件下致病力的分化和组成表现出来。它受三方面因素的制约:气象条件对病菌生物学和病害流行的影响;栽培品种的抗病性;病菌与寄主的接触频率[2]。赤星病在世界主要产烟国家发生消长的情况反映了这些因素的作用。

1. 在美国和其他主要产烟国家

美国1892年在北卡州首次发现烟草赤星病,被认为是该病的首次报道[1],但在其后40年间发生一直很轻。当时在美、欧属于扩大陆地烟草种植的阶段,病菌扩展经过了与寄主的适应和克服烟草分散种植造成的空间阻隔时期;到本世纪30年代烟草种植完成扩大陆地栽培进入提高烟叶产量的时期[5],1931年赤星病在津巴布韦爆发流行[1]。自此到70年代中期,该病一直是美国烟草上的一大病害,造成的经济损失最重时达到每年1 000万美元[1]。此后为害趋轻,1988－1991年仅零星发生,被称作"机会病害"[4]。主要原因是培育和推广了一系列抗、耐病的品种[6],近年一直用作"当家品种"的K236、NC82、NC89等均表现良好的抗或耐病性(表1),同时,烟根、烟秆无菌化处理作为控制根茎病害(黑胫、青枯、根结线虫等病)的主要措施,对降低赤星菌侵染源和传染机会也起了重要作用[4]。

津巴布韦的烤烟品质处美国之下,在世界上属第二位的主要产烟国,以赤星病和白粉病(*Erysiphe cichoracearum*)为主要的叶部真菌病害,但发生和危害程度很轻,主要因为有一批适应不同地理条件的抗病品种,坚持实行与非寄主植物(如玉米)长期循环轮作对病菌传播的年度和地理阻隔也有一定的作用[7]。巴西的情况与此相似[5]。在印度,赤星病主要发生在水烟、嚼烟等晾晒烟和黄花烟上。这类烟草种植面广,接触频率高是它们发病重的主要原因,而对烤烟危害较轻[5,8]。韩国是烤烟出口量较大,也是填料烟叶出口量最大的产烟国[7],青枯病(*Pseudomonas solanacearum*)是其主要病害,赤星病发生较轻,与抗或耐叶斑病品种的种植有关[5]。日本对赤星菌毒素有深入研究。因为赤星病并未造成生产障

碍，故这种研究近年来很少转入对有关病害控制途径（如用毒素胁迫筛选抗病品种）的研究[9]。

2. 在中国烟区

赤星病在 60 年代以前为次要病害，60 年代中期到 70 年代初曾一度在黄滩烟区爆发流行，其后到 80 年代中期因改夏烟为春烟，病菌传染经历了一个与环境和寄主重新适应的阶段，降为次要病害[3]，近 10 年内逐渐回升，1989－1991 年在全国主要产烟省发生1 130多万亩，烟叶损失近 1 000 万公斤，产值损失近 3 000 万元，原因有多种，其中对病害发生规律缺乏研究，未能据此实行有效控制是最主要的。

这表现在以下 3 方面：①规范化连片种植增加了病菌与寄主接触的频率和空气传播的机会。病菌不仅可以在生活寄主（有 60 多种植物[1]）上繁殖，烟秆长期堆放和不进行无菌化处理也是一个重要侵染源，这些来源的真菌孢子还可以互为菌源[2]。因土地面积的限制，连作制度使病害传播的年度和地理阻隔失去作用①。②病菌对不同品种群体和不同环境条件表现出很强的适应性，在栽培抗病品种和气象条件不利于病菌生长和病害流行的条件下，病菌强致病力菌株发生频率高；在栽培感病品种或条件有利于病害流行的情况下，病菌群体以中、弱致病力菌株为主，环境条件有利于病菌孢子的繁殖、传染，增加接触机会[2]。1992 年山东省主要产烟县烟草生长期极度干燥，但调查发现病菌可从叶片边缘侵染并引起发病。③国内没有自己的适应品质要求的抗病品种是另一个主要原因。栽培的"当家品种"均从国外引进，它们在原培育地表现出较强的抗病性，但引进后栽培都表现感病（表 1）[11]。中国不同烟区多样化的气候条件不仅为病害流行提供了基础，还导致病菌通过致病力组成的变化适应各种品种和环境条件，使这些品种可以为不同致病力的病菌种群所侵染[2]。集中到一点就是，由于对病菌生物学和致病性等菌源情况缺乏了解，难以预测引进品种的抗病性反应（这也提出了在引进和推广栽培之间经过一个"驯化"阶段的必要性）。

表 1　赤星病的发生和品种抗性的表现情况

Table 1　Situations of brown spot epidemics and tobacco cultivar resistance in China and USA

病　害	占病害总损失的比例（%）		品种表现		
	美国[a]	中国[b]	品种[c]	美国[d]	中国[e]
黑胫病	24.9	16.9	NC82	3.7 (12.9)	感
青枯病	21.8	7.0	NC89	4.3 (2.9)	感
花叶病	16.4	26.9	K326	2.3 (4.3)	感
根结线虫病	12.1	8.1	Coker 176	3.7 (16.9)	中
赤星病	7.6	13.6	G70	4.0 (5.5)	中

a. 材料见文献[4]；b. 材料见文献[1]；c. Coker176 和 G70 现在中国种植面积很小，另 3 个品种广为种植；d. 括号外的数字是 1990 年病情指数，括号内是 1989 年叶片受害面积（%）；e. 引自文献[11]。

---

① 全国烟草侵染性病害调查研究协作组，《全国烟草侵染性病害调查研究》，1992（未发表）。

目前对赤星病的控制状况是[11]：农业治理基本上未得到实行，如烟秆的存积、土地面积的限制使轮作或间作(阻隔病原物传播)不可行等，而农业治理在美国等主要产烟国家都被列为首要措施，不管品种来自基因工程还是细胞工程技术，这种措施都是必要的[4]；没有有效的化学药剂[12]，化学防治即使有效，也存在一个残毒问题；培育自己的抗病优质品种体系已势在必行，但难以在短期内实现。

二、寄主-病菌互作与病害控制途径

按王金生[13]的评论，寄主-病原物互作有分子水平上的、细胞和组织水平上的、群体水平上的3个相互承接的层次或阶段。分子水平上的互作可以一般地认为是寄主-病原物分子识别[14]，由它引发寄主细胞学上的进而是组织病理学上的变化[15]，这两种互作导致寄主特征性病理学表型(如发病或过敏反应)的产生即病程的完成。它们是发生在个体的植物-病原物体系(也可以说是植物单株上)的互作事件，群体互作则是这种体系集合在所处环境下的综合表现。按基因对基因关系研究群体互作有一套根据寄主群体反应的表型推导基因数目的模型和程式[16]，一个直接功用是为抗病育种中基因源选择和改造的难易提供依据。如果从群体互作在病害流行学上的表现出发，我们发现它可以引导出另一条探讨病害控制的思路(这将在下面讨论)。

在烟草赤星病中，病菌孢子萌发产生的芽管侵入寄主后引起褐色斑，病菌产生的毒素(AT)也可以单独引起这种病变[1]。这包含了两种分子互作机制：①AT作为致病因子与寄主细胞膜上的受体分子结合，引起一系列由质膜功能和结构的改变、细胞死亡到组织坏死的反应[9]；②芽管在侵入前与寄主细胞表面的接触，可以设想受向触性机制控制，并需要病菌与寄主特定物质间的粘联或联结[15,17]，加到接种液中的物质的不同可以改变芽管的行为(寻到侵入部位或沿叶细胞表面生长)[1]。这两种机制导致相同的组织病理学反应和症状。病菌在不同地理和环境条件下及抗病性不同的群体上致病力组成的变化[2]，可以认为是群体互作的结果或群体互作在病害流行学上的表现。根据这3个层次的互作，可以从不同方面研究病害控制的途径。

1. 分子互作与抗病性胁迫选择

赤星菌AT毒素作为致病因子的专化性表现出两个层次：①不同的烟草品种有敏感和不敏感及敏感程度的差别[18]；②在烟草(普通烟)不同品种间有类似情况，但取决于毒素使用的量，品种专化性是在微克级毒素用量时表现的品种敏感性，即有些品种在此条件下发生与毒素的受体结合并导致细胞和组织病变及症状的最后形成[9]。这就提出了一种可能，根据品种的敏感程度提高毒素施用量，可以在细胞和无性系(或愈伤组织)上胁迫筛选抗病性，把其他性状好但不抗病的品种改造为抗病品种，这在不少病害中已成为通常的细胞育种方法[19]。但把AT毒素定义和试验验证为寄主专化性毒素(HST)[9]，虽可以从理论上简化基因对基因关系，按质量遗传对那些毒素敏感的品种进行胁迫筛选[20]，同时也限制了对那些已被证明是数量敏感(高浓度毒素引起病变，低浓度时不敏感)的品种的胁迫选择。日本人甚至为此提供了试验证据：纯化的AT毒素不具有胁迫抗病性的作用[21]。

我们的研究在毒素胁迫的品种可行性上更能支持对不同品种进行抗病性改造的尝试。AT 毒素可以引起寄主的快速反应，不同品种对毒素的反应与它们对赤星病的抗感表现相一致[10]，这是毒素用作胁迫因子的两个必要条件[19]。对植物细胞或愈伤组织生长过程中发生的体细胞无性系变异[10,22]中的抗病性变异，可用毒素胁迫作定向选择，同时，二者对抗病性变异可以相加，在理论上使获得高抗病性突变的无性系和再生植株成为可能[19]。按这种理论进行试验，在以品种 NC82、NC89、K326 等为材料经愈伤组织毒素诱导获得的再生植株上，赤星病明显减轻[23]。这对难以在短期内建立自己的抗病优质品种体系的中国烟草业，提出了品种改造和利用的可行性。

2. 互作的导误与利用

烟草赤星菌属于直接侵入寄主的真菌。这类真菌侵入前要与寄主表面发生 5 种互作反应：①由寄主向化性信号诱导的芽管萌发和生长；②芽管或菌丝对寄主的吸附；③芽管的定向生长；④附着胞的形成；⑤从特定部位侵入寄主[15,24]。这一过程由特定机制控制，例如：菜豆单胞锈菌(*Uromyces phasecoli*)孢子萌发后的芽管由寄主表皮细胞角质层的脊状突起的向触性信号引导而向气孔位置生长，到达气孔瓣时停止生长并开始形成附着胞，气孔分泌物和气孔瓣的柔软结构特征刺激和启动附着胞的形成[15]。来自寄主、其他生物及物理、化学的因素一旦对这种机制产生干扰或抑制，就会发生"互作导误"，表 2 是几个例子。这种互作导误在病害控制中显然很有利用价值。

表 2 发生在寄主表面的互作导误类型和机制举例

Table 2 Types and mechanisms of induced mistakes of host-pathogen interactions

真菌	导误类型	机制
锈菌 (*Puccinia*, *Uromyces*, *Cronartium*)[25]	1. 芽管壁增厚伴生二级孢子或曲折生长	大水滴厌气，挥发性物质的作用
	2. 芽管非定向生长，不吸附，不能识别气孔	缺少对蜡质表面的吸附能力
	3. 能吸附但不形成附着胞	气孔的触性信号不稳定
	4. 在气孔以外的部位形成附着胞	不同于气孔的触性信号
	5. 形成附着胞但不能侵入	邻近细胞的结构、CO_2 等抑制侵入丝的形成
	6. 正常互作[16]：芽管沿细胞壁脊突生长，从气孔侵入	向触性信号、气孔瓣结构与脂类物质的变化诱导附着胞形成
炭疽菌 (*Collectotrichum*)[25]	1. 不形成附着胞	营养过剩
	2. 不形成侵入丝	受抑或休眠
丝核菌 (*Rhizoctonia*)[25]	1. 菌丝不吸附，不能定向生长	缺少吸附因子
	2. 不形成侵入机构	缺少化学刺激：营养过剩等
烟草赤星菌 (*Alternaria alternata*)[1,26-30]	1. 孢子不萌发或芽管生长慢	弱毒株诱导寄主抗病吸附抑制
	2. 芽管不附着	弱毒株诱导寄主抗病吸附抑制
	3. 芽管无限制生长，不能侵入	碳营养过剩，水膜持续期长
	4. 芽管侵入能力降低	寄主阶段抗病，叶面微生物制约等

在烟草赤星病中可以发生 4 种互作导误(表 2)，导误的原因有时有多种并相互影响，

例如叶面微生物对病菌的制约作用既可以引起芽管行为的变化，也可以干扰寄主-病菌在组织和细胞水平上的互作[27,28]，落在叶表面的花粉也有这种作用[1]。碳素营养过多和叶面100%湿度条件超过12小时，可以导致芽管无限制生长而不侵入寄主。这些都可以在一定时间内降低侵染机率和寄主发病程度[1]，但很难设想在烟草整个生长期这种条件会持续地维持或由人工施加而持续维持。导误的利用在3种机制上显示出很大潜力：①诱导抗性引起的病菌侵入前行为的改变。②可以表现吸附抑制作用的因子的利用。病菌孢子细胞壁与寄主表面的联结对完成互作的必要性是其基础[17]，病菌弱毒株热杀死的孢子和细胞破碎物喷洒到烟叶表面后能明显降低赤星病在人工接种和大田条件下的发生程度，在烟草不同生长期使病害减轻20－70%；接种的病菌强毒株孢子对叶面的吸附能力降低，易为水冲洗掉（作者，尚未发表）。对这种起吸附抑制作用的细胞壁成分有必要作定性研究，它的提取物或结构类似物可以单独使用，也可用作灭活孢子吸附抑制的增强剂使用，这在其他病害控制中已有尝试[24]。③叶面微生物作为互作导误因子的利用。烟草叶面存在两类无致病作用的微生物，一类是病菌的非致病力菌株，孢子萌发后的芽管可在寄主叶面附着并生长，芽管表面还可联结不同类型的非病原细菌，在田间试验中可以明显抑制致病性菌株芽管的生长，使发病程度降低60%[27]。另一类是非病原微生物，早些时候的研究表明烟叶表面和组织内存在18种这类微生物，研究者只注意到它们的潜在为害[29]，通过种群强化用于病害控制的可能和途径仍需研究。把根际或土壤非病原菌引入叶面的尝试显示出一定的防病效果[28,30]，但作用大小取决于它们对叶面环境的适应和叶面定殖能力；这类非病原菌在室内接种中有明显（40－60%）的防病效果[30]，但在田间试验中因烟区条件而变（作者，尚未发表）。它们直接参与寄主-病菌互作，作为病害控制手段的效果也就取决于它们对这种互作体系的适应能力[11]。

3. 诱导抗性

植物诱导抗病性泛指用各种手段刺激植物产生抗性（表型）而减轻发病的现象。诱导因子在种类上极为广泛，包括不同的微生物、化学物质和物理刺激方法[25]。从互作的层次机制看，它是通过改变互作的基因关系实现的：抗性诱导使植物潜在的抗病基因表达为抗病表型[31]。

至少有4类因子可以诱导烟草对赤星病的抗性：病原菌弱毒株[32]和AT毒素[33]，非病原细菌、某些化学物质[30]及某些病毒。在利用诱导抗性控制植物病害的5条途径[25]中，可从3个层次上研究它对赤星病的控制作用和应用技术。①在群体互作层次上：弱毒株作为诱导因子通过直接参与互作起作用，它们在抗病性强的品种群体中和不适应病害流行的环境条件下不成为引起发病的病菌种群[2]，在种群强化和提前接触烟草叶面的情况（可由人工增殖和喷洒[33]）下，它们诱导烟草对赤星病系统抗性的能力[30,32,33]，叶面喷洒作为诱导处理手段的有效性[33]，可在田间植株上产生系统性诱导抗性相加的效应。菌株致病力的稳定性是一个关键，在人工接种条件下，弱毒株的致病力并不为重复接种（连续12代）所加强[34]。可以预测它们在田间寄主群体上致病力变强需较长时间（甚至不发生变化），但真正应用时必须在控制传播的条件下验证这种可能性。②在细胞和组织水平上：除毒素作为诱导因子的胁迫选择途径外，另一种作法是通过细胞和组织培养过程中无性系变异对诱导抗性可能产生的稳定化影响[19]，把诱导抗性转移给再生植株，这一途径的作

用取决于再生植株种子保持诱导抗性和后代植株表达诱导抗性的能力，在理论上是一种探索，在应用中也有少数成功的例子[25]。③在基因水平上：诱导处理在遗传控制上或因“潜在的”抗病基因去阻遏，或因这种基因的被活化（如诱导刺激使它的启动子序列表达），把这种能够表达的诱导抗性基因序列进行分离、组装并转化其他性状好但不抗病的品种，是首先可以设想的一条基因工程途径[35]。但目前只是定性了抗性诱导的基因产物，即病程相关（PR）蛋白质，并通过体外合成从 mRNA 到 cDNA 鉴定诱导抗性的基因控制[25]。由此引导的基因工程途径的研究不是着眼于植物而是着眼于微生物；已定性的 PR 蛋白质主要是几丁质酶和 β-1，3-葡聚糖酶[36]，从细菌中分离和克隆它们的编码基因并转化植物的研究尚在进行中[37]。

三、结　　语

根据寄主-病原物互作研究植物病害控制具有一般的适应性，互作的层次性使应用研究可以是多途径的，也使得在不同技术条件下对病害进行有效控制成为可能。烟草赤星病是一种成熟期叶部病害[1]，烟叶生产的产量和品质要求既提出了病害控制的紧迫性，又要求在品种改良中必须兼顾抗病性和产量、品质方面的性状。对烟叶安全性的要求使诸如利用互作导误等途径替代化学 防治成为必要，而通过毒素胁迫等手段对现在种植的引进品种进行改良应该以自己的品种体系的建立为目标；在可以利用的各种生物来源的抗病基因中，诱导抗性只是对寄主内在抗病机制的诱发和利用，它的好处一是植物存在对各种微生物有抗性潜能的基因供诱发，二是可以保持品种其他好的性状，三是诱导抗性表现出对抵抗多种病原物都有效的多抗性[25]。

参 考 文 献

[1] Lucas，G. B.，Diseases of Tobacco(3rd ed.)，Raleigh，N. C.：BCA，1975，267--296.

[2] 董汉松、初明光、杨合同、田福海、张修国、王智发、姜广正，中国烟草赤星病菌致病力在地理上和品种中分化状况的研究。山东科学，1993，**6**(2)：25－32。

[3] 陈瑞泰、王智发、王念慈，烟草病虫害防治，济南：山东科学技术出版社，1988，10－17。

[4] Melton. T. A.，Porter，D. and K. Wood. Disease management practice. Flue-Cured Tobacco Information，Raleigh，N. C.：The North Carolina Agricultural Extension Service，1991，81－107.

[5] CORESTA Inf. Bull. CORESTA Symp. Kallthes，Greece：CORESTA，1990，55－84，135－190.

[6] Stavely，J. R.，Gwynn，G. R.，Chaplin，J. F.，Graham，T. W. and C. E. Main. Brown spot resistance in *Nicotinan tabacum* germplasm，Tob. Sci.，1981，106--11.

[7] 张永耀、孙立松、卜晓东、姜　荣、董汉松、张建华，津巴布韦烤烟生产技术，上海：上海科学技术出版社，1992。

[8] 张务水，印度莫提哈里烟草（黄花烟）对赤星病的反应，国外烟草，1992，**2**：22－23.

[9] Nishimura，S.，Vance，C. P. and N. Doke，Molecular Determinants of Plant Diseases，Tokyo：Jpn. Sci. Soc.，1987，119－144.

[10] 董汉松、曲建军、王智发，烟草对赤星菌毒素的快速反应及在品种抗病性鉴定中的作用。中国烟草学会第二次会员代表大会会刊，中国烟草学会，1992，74－80。

[11] 董汉松、王智发，烟草侵染性病害防治面临的难境与对策，中国烟草，1990，**2**：10－13。

[12] 李　桐，烟草赤星病的发生与防治研究初报，烟草科技，1991，**5**：40－43。

[13] 王金生，寄主-病原物互作，农业生物技术进展与展望——国家 863 计划生物技术领域第一主题学术研讨会论文

选编'92(贾士荣主编),合肥:中国科学技术大学出版社,1993,56－64。
[14] 董汉松,植物识别子与病原细菌识别子间的互作,植物生理学通讯,1991,**27**:391－396。
[15] 董汉松,寄主植物与病原微生物间的相互识别,农业生物技术进展与展望——国家863计划生物生物技术领域第一主题学术研讨会论文选编'92(贾士荣主编),合肥:中国科学技术大学出版社,1993,65－79。
[16] Leonard,K. J. and R. J. Czochor. Theory of genetic interactions among populations of plants and their pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 1980,**18**:237－258.
[17] Daly,J. M. The role of recognition in plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 1984,**22**:273－307.
[18] Burk,L. G. and R. D. Durbin. The reaction of *Nicotina* species to tentoxin. J. Heredity,1978,**69**:117－120.
[19] 董汉松、张春玲、陈瑞泰,烟草抗性基因遗传变异和遗传工程及其对育种策略的影响,烟草学刊,1991,(2):9－22.
[20] Tsuge, T. Host-Specific Toxins. Tottori:Totlori Univ. Press,1989,153－170.
[21] Kumashiro,T. Selection for tenuazonic acid tolerant cells of tobacco and characteristics of the regenerates. Jpn. J. Breeding,1983, **33**(Suppl. 1):194－195.
[22] Cubitt,I. R. , The commercian application of biotechnology to plant breeding. Plant Breeding Abstr. 1991,**61**:151－158.
[23] 卢培秀、董汉松、王智发、郑继法,在植株和愈伤组织上用AT毒素诱导烟草对赤星病抗性的研究,中国植病学会华北区分会第六届年会论文摘要集,1992:80－81。
[24] Wynn,W. K. Tropic and taxic responses of pathogens to plants. Annu. Rev. Phytopathol. 1981,**19**:237－255.
[25] 董汉松,植物诱导抗性的机制和应用前景,植物抗性生理研究(赵可夫主编),济南:山东科学技术出版社,1992:195－201。
[26] Stavely,J. P. and L. J. Slana. Relation of leaf age to the reaction of tobacco to *Alternaria alterata* Phytopathol. ,1971,**61**:73－78.
[27] Spurr. Jr. H. W. Protective application of conidia of nonpathogenic *Alternaeria* sp. isolates, Phytopathol. , 1977,**67**:128－132.
[28] Fravel,K. R. and H. W. Spurr,Jr. Biocontrol of tobacco brown-spot by *Bacillus cereus* subsp,*Mycoides* in a controlled environment. Phytopathol. **67**:930－932.
[29] Spurr. Jr. H. W. and R. E. Welty. Incidence of tobacco leaf microflora in relation to brown spot disease and fungicide treatment. Phytopathol. ,1972,**62**:916－920.
[30] 董汉松、于建立、卜晓东、尹东升、孙立松,三类因子在烟草抗赤星病诱导中的作用,山东科学,1993,**6**(2):47－52.
[31] Tuzun,S. ,Juarez,J. ,Nesmith,W. C. and J. Kuc. Induction of systemic resistance in tobacco against metalaxyltoerant strains of *Peronosporn tabacina* and the naturel occurrence of the phenomenon in Mexico. Phytopathol. 1992,**83**:425－429.
[32] 董汉松、王智发,烟草赤星病菌致病力分化和弱毒株抗性诱导作用的研究,植物保护学报,1992,**19**:87－90。
[33] 董汉松、于建立,赤星菌弱毒株TBA16对烟草抗赤星病诱导作用条件的研究,中国植病学会华北区分区第六届年会论文摘要集,1992,81。
[34] 董汉松、曲建军、王智发、杨合同、宗树林,烟草赤星病致病力变异的研究,山东科学,1993,**6**(2):20－24。
[35] Kuc,J. Exprssion of latent mechanisms for resistance to blue mold and other disease in tobacco. CORESTA Inf. Bull. 9th Tob. Sci Cong. Guangzhou:CORESTA,1988,25－43.
[36] Pan,S. Q. ,Ye,X. S. and J. Kuc, A technique for detection of chitinase ,β-1,3-glucanase,and protein patterns after a single separation using polyacrylamic get electrophoresis or isoelectrofocusing. Phytopathol. 1991,**81**:970－974.
[37] Metraux,J. P. ,Burkhart,W. ,Moyer,M. ,Dincher,S. ,Middlesteadt,W. , Williams. S. ,Payne. G. ,Carnes,M. and J. Ryals. Isolation of a complementary DNA encoding a chitinase with structural homology to a bifunctional lysozyme/chitinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,1989,**86**:896－900.

POTENTIAL AND PRACTICAL APPROACHES FOR CONTROL OF TOBACCO BROWN SPOT BASED ON THE HOST-PATHOGEN INTERACTIONS

Dong Hansong, Lu Peixiu and Yang Hetong

The epidemic situations were reviewed of tobacco brown spot in the countries with economic significance of tobacco production in the world, indicating that the disease had been distributing country wide and causing increasing losses in China during last decade. The reasons were presented with experimental evidences, especially with those in the host-pathogen interactions. The effective ways for disease control were believed to be dependent on the interactions, which follow different mechanisms at colonial, cellular, histopathological, molecular and genetic levels. Based on these mechanisms, the potential and practical strategies for controlling the disease were presented as follows: ① selecting resistance by pressuring the host cells or calli with the pathogen toxin as a pathogenicity factor; ②utilizing the mistakes in the contact recognition of the host with the pathogen; ③applying induced resistance of the plant, by direct application of some inducers, by transduction of induced resistance from induced plants to regenerates and their seeds *via* tissue culture, and by genetic engineering by which the genes activated by inducing treatment could be transfered to the cultivars with satisfactory phenotypes in agronomic and qualitative characteristics.

烟草抗病基因变异源的利用与抗病育种策略

董汉松　张春玲　杨合同　王少杰

要想对某一性状进行改良，首要条件是必须选择理想的等位基因。烟草所有抗病新品种的产生均以有充分的基因变异资源可用为基础。50年代初，对烟草栽培品种(系)群体感病性差异的利用，导致了新的烟草类型或品种的产生。如从抗根黑腐病(*Thielaviopsi obsicola*)的自花授粉植株中选择种子，产生了抗病和耐病的雪茄烟[1]。利用类似方法选出了抗青枯病(*Pseudomonas solanacearum*)的烤烟及抗黑胫病(*Phytophthora parastica* var. *nicotianae*)的白肋烟和烤烟品种[2]。

因对各种病原物的抗病基因尚未在普通烟(*Nicotiana tabacum*)中全部找到，人们自40年代开始从其近缘种和野生种中引入种质抗源，并在遗传控制比较简单的病害中获得成功。到80年代末，来自*N. glutinosa*的抗烟草花叶病毒(TMV)基因，来自*N. longiflora*的抗黑胫病及抗野火病(*P. tabaci*)基因，来自*N. goodspeedii*和*N. velutina*的抗霜霉病(*Peronospora tabacina*)基因，均已转移到普通烟的栽培品种中[3]。

进入90年代，*N. africana*等野生种成为最活跃的种质利用对象[4]，同时，对白粉(*Erysiphe cichoracearum*)、野火和赤星(*Alternaria alternata*)[5]，对霜霉[6]，对黑胫和根黑腐[7]，以及对主要病毒病[8]等世界性重要病害的抗源，分别在不同的野生种和普通烟的近源种中进一步发现。在对这些种质抗源的利用中，种间染色体重组的不亲和性及抗病基因与其他不良基因的连锁是主要限制性问题。针对这一问题，在利用途径和方法上也有广泛研究[9,10]。下面谈到的基因变异的新来源，就是增强这些种质抗源的可操作性的有效途径和手段。对用于替代待改良基因的基因变异的操作能力，是育种成功的另一个关键。

一、基因变异的新来源

1. 体细胞杂交(Somatic hybridization)

(1)方法与利用潜能：体细胞杂交即原生质体融合，用不同种类的细胞壁降解酶处理植株细胞而得到裸露的原生质体，然后经体外培养促进细胞壁再生、细胞生长和分化与植株的再生[11]。在适当的条件下，来自不同种的原生质体可以融合产生细胞杂合子。利用这一技术，已经实现了烟属(*Nicotiana*)内不同种间，以及此属内与属外种间的原生质体融合[12]。Amin-Gendy等[9]报道，原生质体融合法可以产生对病原物和各种环境胁迫具有抗性的细胞杂合子。Georgieva等[11]已用此技术获得了抗霜霉病的再生植株。在抗黑胫病等病害的抗性体细胞杂合子的研究中也有不少成功的报道[7,13]。

从理论上讲，体细胞杂交技术作为向栽培烟草转移多种(抗病)基因的方法具有极大的潜力。首先，由于亲本的原生质体是双倍体，或拥有体细胞染色体数，这就在遗传上保证了种间体细胞杂合子至少是部分可育的[2]。第二，体外培养技术可以做到仅对培养的细胞

施加有利于杂合细胞生长的选择力，并可以对不易存活的杂合子进行“营救”处理以增强其存活力[13]。第三，原生质体融合程序可以导致来自两个种的细胞器的混合[14]，而雄性不育或雄性可育受细胞质而非核遗传基因的控制，因此这一技术作为雄性不育的转移方法具有特殊意义[15]。

由原生质体融合程序已经获得了不同类型的体细胞杂合子的再生植株，包括两个亲本间细胞器的融合或杂合子含有一个亲本的细胞核而补以另一个亲本的细胞器等情况[13,14]。Aviv 和 Galum[15]指出，后一种情况表明细胞质携带的雄性不育可通过原生质体融合从一个种转移到另一个种。基本做法是，作为细胞质供体的原生质体经适量的 X 射线处理，在不发生细胞器损伤的情况下消除细胞核的整合；射线处理后的原生质体再与基因型待转化为雄性不育的原生质体（受体）融合；胞质雄性不育以及与其连锁的基因（如线粒体携带的基因）间的重组的发生，可在再生植株上得到表达。Kofer 等[14]研究表明，利用这一程序可以获得具有新型雄性不育或雄性可育的种间体细胞杂合子的再生植株，这种再生植株的细胞壁也同时表现出两个亲本的特征[14]。

（2）问题和解决方法：体细胞杂交技术虽具以上多方面的应用潜力，但在实践上对改良烟草性状的价值目前还非常有限[2]。主要问题是体细胞杂合子的存活能力很低，大多数不能存活到种子阶段，甚至有少数杂合子只能存活几个细胞周期[16]。普通烟与 *N. repanda* 间的体细胞杂合子虽然可从后一个亲本中获得对多种病害具有高抗能力的基因，但在接合子阶段就死亡了[17]。

Zenkteler 和 Melchers[16]指出，体细胞杂合子的存活有两个条件，一是两个亲本在体细胞杂交中的总体亲和力比较强，种间体细胞杂交容易发生；二是对难以保持持续存活能力的杂合子胚胎施行了体外“营救”处理。Evans 等[12]将普通烟与 *N. nesophila* 进行体细胞杂交，得到了两类体细胞杂合子。其中一类可借助一般的育种措施而获得后代植株；另一类含有来自后一个亲本的抗黑胫病基因，须在一般杂交程序之后，对体外培养的细胞进行特殊处理，或促使未成熟胚的萌发才能获得有存活力的种子[13]。

Wernsman[2]认为，种间染色体的非同源性是遗传学上的根本限制，这使得种间染色体难以获得对等重组，导致杂合子难于产生，或者即使产生了杂合子，其重组基因的表达也往往难以协调。因此，着眼于改善非同源染色体间的亲和性、在杂合子阶段前就进行“营救”，有可能从根本上解决杂合子的自我致死问题。对不同的杂交组合来说，“营救”措施有必要施用于从体细胞培养到再生植株产生种子这一整个过程。目前人们已从调节细胞培养的外加激素、离子等条件[9]来实现这一目的，同时对培养细胞和杂合子的跟踪检测方法也作了不少研究[16,17]。

2. 体细胞无性系变异(somaclonal variation)

（1）变异类型和利用价值：体细胞无性系变异这一概念是从无性繁殖的植物群体所发生的基因变异派生出来的。Larkin 和 Scowcroft[20]把它定义为由体外培养而产生的再生植株的基因变异，包括染色体数目的变异、染色体结构畸变和基因突变 3 种类型。

体外培养过程中烟草染色体数目的变异最早于 1966 年被发现[21]。以后更多的研究表明培养的体细胞较植株发生这种变异的频率增高；从单倍体植株的叶蝶长成的枝条表现出高比率的可育性，而且培养和再生过程中可以自行发生染色体的加倍[22]。因此，体外

培养现已被用作烟草单倍体和种间杂合子加倍的手段。另外，体外培养中还发现各种非整倍体，约占再生植株的 10%，需借助细胞质分析法加以鉴别和剔除。

染色体结构畸变包括染色体互换、倒位、亚染色体交换和缺失等多种类型[23,24]。但由于烟草的染色体很小，严重限制了对这些染色体变异的分析，使它们在烟草基因改良中价值很有限。

单一基因的突变发生的频率通常很低，约每 10^6 细胞分裂发生一次。研究表明体外培养可以提高基因突变的频率[12]。这对烟草基因的改良显然是很有用的。

(2)抗病性变异的筛选：在烟草上已形成一套技术，用以鉴定和筛选有利用价值的体细胞无性系变异。抗病性变异的筛选方法有 3 种：①用病原物接种体外培养产生的再生植株；②用常规剂量的病原物毒素，对有繁殖能力的细胞（表明抗毒素）加以筛选；③用病原物接种培养的细胞或愈伤组织。方法的选用应依抗病性基因表达的阶段而定。由普通烟和 *N. africana* 杂交的后代经体外培养产生的加倍的单倍体无论在组织培养阶段还是在再生植株阶段，均对烟草矮花枯萎病毒（TSWV）表现抗性[18]；由普通烟和 *N. plumbagirifolia* 杂交产生的杂合子同时带有来自两个亲本的抗黑胫病基因，它们的表达情况与上相似[25]。在这两种情况下，以上 3 种方法均可用。对霜霉病抗和感的烟草基因在愈伤组织阶段均不表达[17]，显然不能用方法②和③进行测定。

方法②在操作和抗病性定向选择两方面均有很大的优越性。一是植物细胞既可定量，又可获得很高的群体用于选择；二是可通过调节毒素的施加量对细胞进行定向选择。用作用机制和效应与野火菌毒素和赤星菌毒素相似的物质——硫代肟基甲硫胺酸（MSO），施用于敏感烟草的培养细胞，已筛选出抗野火病和赤星病的再生植株[26]。国内用病原物毒素对诱变后的烟草培养细胞进行选择，已筛选出了对黑胫病具有抗性的细胞系[27]。

3. 配子体单克隆系变异(gametoclonal variation)

(1) DH 系的产生与利用潜能：花药体外培养可从微孢子或未成熟花粉产生大量的单倍体植株[28]，染色体加倍后产生同源性的加倍双倍体（doubled haploild）[29]，这种加倍的单倍体植株群体及其后代被称为 DH 系（dihaploid line）。这一技术作为烟草基因变异源的利用途径具有很大价值。表现出 5 个方面的优势。

1) 变异的可加性：对来自普通烟品种的 DH 系农艺性状以及 *N. sylvestris* 近缘系的最初研究表明，DH 系产生程序可导致不可预测的基因变异[29,30]；对第一个周期产生的 DH 系重复花药培养过程，可使基因变异继续发生，同时使第一个周期发生的变异基因的表达加强[29-31]。这就可以对理想的基因变异进行定向选择，同时可对伴随的不良性状进行改良。

2) 农艺性状简化：Deparepe 等[30]对 *N. sylvestris* 近缘系的研究表明，DH 系产生程序可使农艺性状的表达得到简化，有利于对抗病性的单目标选择；DH 系的基因互作关系比较简单是性状简化的主要原因。同时，农艺性状的简化还可通过对单倍体的定向选择实现[30]。

3) 隐性突变基因和多抗基因型组合的表达：花药培养中的隐性抗病性基因突变，可在高度同源的 DH 系基因中得到表达。Witherspoon 等[32]对高感马铃薯病毒 Y(PVY)的烟草品种 McNair 944 的单株进行花药培养，得到了对 PVY 坏死株系(NN)表现耐病的

单倍体植株，加倍后的 DH 系定名为 NC602。它对 PVY 的其他株系和烟草蚀纹病毒（TEV）不具耐性或抗性，这种抗性和耐性存在于烤烟品种 Virgin A 突变体（VAM）中。VAM 的抗病（耐病）基因与 NC602 的 NN 耐病基因同为隐性但非等位关系[33]；Yung 等[34]把这两种基因结合后对 PVY 的各种株系表现广泛抗性。另一个品种 NC152 是 *N. africana* 花药培养产生的 DH 系，Wernsman[8]指出它带有对 TEV 和 PVY 的双抗基因（TPR）。TPR 是显性基因，但与 NC602 的耐 NN 基因和 VAM 抗 PVY 基因不是等位关系。Wernsman 等[2]打算把这 3 个基因结合在一个基因型中，以获得对各种病毒的广泛抗性或耐性。

4）基因变异的稳定性：多种研究表明，DH 系产生过程中的基因变异一般发生在核染色体上，伴随着染色体的扩增，但染色体数目不变[35,36]。这就使得染色体加倍易于进行，同时使得 DH 系基因组成稳定。

5）可控性：花药细胞悬浮培养易于定量和控制，还可在染色体加倍处理中施行控制。Patrascu[35]研究表明，控制秋水仙碱的施用量，可以获得预期的加倍效果。

（2）问题和解决方法：DH 系产量严重降低是配子体单克隆变异利用中的限制性问题。来自烤烟品种 NC95 花药培养的自交系 NC95-DH 与亲本自交后代相比，产量降低 25%[37]。上述 NC602 较其亲本 McNair944 产量也显著降低[34]。

目前常用体外重复培养的方法克服这一缺陷。Yung 和 Wernsman[32]对 NC95-DH 重复 3 个周期的花药培养程序，可使产量达到 NC95 的水平；Yung 等[34]对 NC602 作同样处理，也获得类似效果。重复培养对 DH 系的增产作用，是变异的可加性所致，还是产量性状的表达对 DH 系产生程序适应的结果，目前还在研究中。但由 DH 系产生的种子现已开始初步应用；NC602 的抗病能力已得到全面验证，1990 年已开始在美国区试项目中接受对多重环境适应性的测定[2,8]。这是利用配子体单克隆系变异选育抗病 DH 系的一个范例。

二、育种方法和育种策略的改良

1. 单倍体作为育种选择单位

利用野生烟与普通烟的花粉进行杂交，是烟草杂种优势利用的一条重要途径。传统的系谱选育法常遇到两个问题，一是这种杂交一代的种子萌发后有 99.9%在子叶期死亡[2]，成活的植株混杂有单倍体和各种非整倍体，可供对改良性状进行鉴定的植株选择频率非常低[38]。二是秋水仙碱加倍的频率通常只有 20%，而且效果不稳定[22]。系谱选育中通常是在加倍后的植株群体中对目标性状进行选择，不仅选择量大，而且具有盲目性，选中的机率非常低，许多研究者试图用 DH 系产生程序取代系谱育种法，以单倍体的配子体作为育种选择单位对待改良的性状进行选择[31]。这一方法的改良除了具有前文所述的优势、可以增强选择的目标性之外，由于花药培养可以产生大量的单倍体植株，这种选择因而具有很大的数量优势。

单倍体作为育种选择单位的可行性，必须以性状选择的有效性和准确性为前提。Rufty 等[39]在对 *N. glutinosa* DH 系利用的研究中，分别用单倍体和加倍的单倍体植株的离体叶片测定对 TMV、线虫（*Meloidogyne incognita*）和野火病的抗性，发现单-双倍体测定的一致性为 90%以上。在对 PVY 抗性的测定中也获得相似的结果[40]。Tebford 等[41]和

Main[42]对黑胫病的研究，董汉松等[43]对赤星病的研究，均表明离体叶片测定法与苗期和田间鉴定的结果是一致的。

为了把对 DH 系产量性状的改良与单倍体作为选择单位的有效性验证结合起来，Witherspoon 和 Wernsman[41]先从普通烟和 *N. africana* 间的杂交种子中筛选可存活的单倍体植株，在病圃中测定它们对黑胫病的抗性；从抗病植株取顶芽经生根处理后获得成长植株，由此成长植株的叶中脉取叶蝶经体外培养获得 DH 系，再在病圃中对 DH 系植株作抗病性测定。结果是，单倍体植株与 DH 系植株的抗病反应高度一致。

以上研究表明，以单倍体为单位选择对多种病原物的抗性具有很高的有效性和可信性。这一程序还可以排除异质性显性抗病基因的影响[2]，同时使对 DH 系抗病性的进一步鉴定得到简化。如果在单倍体抗病性选择中引入基因操纵程序，即把带有选择标记的嵌合基因插入单倍体染色体，抗病性选择便可在培养基上进行。

2. 抗病育种的新策略

Wernsman[2]认为，在今后 50 年内烟草育种将对改善烟草生产产生主导性影响，烟草生产的继续发展在很大程度上依赖于各种基因资源的利用和含这些资源的抗病品种的栽培。烟草抗病育种新策略主要包括两个内容，一个是对抗病性和产量、品质性状的同时改良，二是实现这种改良的主要途径是利用各种基因变异源。

抗病能力与产量、品质性状的共同改良仍是一个突出问题，朱尊权[45]估计从 50 年代到 80 年代，我国烟草产量提高的平均速率是每年 25kg/ha；Bowen 等[46]估计美国同期内的产量增长速率为每年 12kg/ha，但烟叶品质的改善却困难得多[2]。体外培养技术和基因工程尚未做到对抗病性与产、质性状的同时改良。许多研究者已注意到对多项性状的共同改良的势在必行，Ioammidis 和 Vasilifadis[47]对香料烟雄性不育的研究，Palakartcheva 等[4]对 *N. goodspeadii* 在杂种优势利用中的作用的研究，同时兼顾了对形态、产量、品质、化学性状和抗病性的改良。

发掘和利用各种基因变异源是烟草抗病育种的一项重要策略。这些基因变异首先来自烟草的不同种，上述 3 种新的技术是促进这些变异和提高它们的利用价值的重要手段，但在多数研究中它们仍然仅是有利用潜能的基因变异，这些基因源的充分利用和"品种化"仍需进行大量研究。另一类基因源来自非烟草的生物，基因工程技术的应用，使包括原核生物、真菌、病毒和各种高等动植物的抗源向烟草的导入成为可能；而烟草体细胞、原生质体及组织器官易于体外操作的特性，可以加快这一进程。对此，作者将另作讨论。

参 考 文 献

[1] Clayton, E. E., Plant Diseases, USDA Yearbood of Agriculture, 1953, 548—553.
[2] Wernsman, E. A., CORESTA Inf. Bull., CORESTA Symp., Kallithea, Greece, 1990, 55—84.
[3] Wernsman, E. A. and R. C. Rufty, In: W. R. Febr, ed., Principles of Cultivar Development, Vol. 2, Crop Science, Macmillan Pub. Co., New York, NY, 1987, 669—698.
[4] Palakartcheva, M. et al., In the same book as in Ref. 2, 141.
[5] Smeeton, B. W. and Ternouth, R. A. F., In the same book as in Ref. 2, 179.
[6] Delon, R., In the same book as in Ref., 2, 180.

[7] Nielsen, M. T., In the same book as in Ref. 2, 181.
[8] Wernsman, E. A., In the same book as in Ref. 2, 182.
[9] Amin-Gendy, C. et al., In the same book as in Ref. 2, 171.
[10] Georgievea, I. D., In the same book as in Ref. 2, 183.
[11] Takebe, I. et al., Nature, 1971, **58**: 318-320.
[12] Evans, D. A. et al., Sci., 1981, **213**: 907-909.
[13] Reed, S. M. and Collins, G. B., J. Hered., 1978, **69**, 311-315.
[14] Kofer, W. K. et al., Theor. Appl. Genet., 1990, **79**: 97-102.
[15] Aviv, Di. and Galun, E., Theor. Appl. Genet., 1980, **58**: 121-127.
[16] Znkteler, M. and Melchers G., Theor. Appl. Genet., 1978, **52**: 81-90.
[17] Reed, S. M. and Rufty, R. G., Tobacco Sci. 1985, **29**: 53-56.
[18] Doroszewska. T. R. C. and Berbec, A., In the same book as in Ref. 2, 176.
[19] Edreva, A. et al., In the same book as in Ref. 2, 168.
[20] Larkin, P. J. and Phillips, W. R., Theor, Appl. Genet., 1981, **60**: 197-214.
[21] Murashige, T. and Nakano, R., J. Hered., 1966, **57**: 115-118.
[22] Kasperbauer, M. J. and Collins, G. B., Crop Sci., 1872, **12**: 98-101.
[23] McCoy, T. J. et al., Can. J. Genet. Cytol., 1982, **24**: 37-50.
[24] Orton, T. J., Theor. Appl. Genet., 1980, **56**: 101-112.
[25] Deaton, M. et al., Theor. Appl. Genet., 1982, **63**: 65-70.
[26] Thanutong, P. et al., Theor. Appl. Genet., 1983, **66**: 209-215.
[27] 周嘉平等,烟草学刊,1990,(2):17-25.
[28] Bourgin, J. P. and Nitsch, J. P., Ann. Physiol. Veg., 1967, **9**: 377-382.
[29] Burk, L. G. and Matzinger, D. F., J. Hered., 1976, **67**: 381-384.
[30] Depaepe, R. et al., Plant Sci. Lett., 1982, **88**: 11-28.
[31] Dimitrova, S. K., In the same book as in Ref. 2, 137.
[32] Witherspoon, W. D. et al., See Ref. 2.
[33] Koelle G., Der Zuchter., 1961, **31**: 71-72.
[34] Yung, C. H., Phytopathol., 1990, **80**: 1863-1871.
[35] Patrascu, M., In the same book as in Ref. 2, 138.
[36] Matzinger, D. F. and Burk. L. G., J. Hered., 1984, **75**: 167-170.
[37] Schnell, R. J. and Wermsman, E. A. A., Crop Sci., 1986, **26**: 84-88.
[38] Burk, L. G. et al., Sci., 1979, **206**: 585.
[39] Rufty, R. C. et al., Phytopathol., 1987, **77**: 60-62.
[40] Gooding, G. V. et al., Plant Dis. Repr., 1973, **57**: 200-204.
[41] Tedford. E. C. et al., Plant Dis., 1990.
[42] Maia, N. et al., In the same book as in Ref. 2, 166.
[43] 董汉松、王智发,山东农业大学学报,1989,**20**:1-8.
[44] Withersopoon, W. D. et al., Crop Sci., 1989, **29**: 125-129.
[45] 朱尊权,烟草学刊,1990,(1):2-9.
[46] Bowman, D. T. et al., Tobacco Sci., 1984, **28**: 30-35.
[47] Ioannidis, N. and Vasilidis, G., In the same book as in Ref. 2, 139.

GENETIC VARIATION SOURCES AND BREEDING STRATEGIES FOR DEVELOPING TOBACCO WITH DISEASE RESISTANCE

Dong Hansong Zhang Chunling
Yang Hetong Wang Shaojie

The selection of genetic sources for disease resistance is suggested to be significantly important for plant breeding. The technology of somatic hybridization and somaclonal variation not only enlarges the range of genetic variation for disease resistance in tobaccos, but also makes them easy to be handled in breeding process. Based on the gametoclonal variation and the procedure for doubling sporophyte haploid, the haploid sporophyte is tendencious to be used as selection unit in plant breeding. This improved method not only results in the production of new cultivars or lines of tobaccos, in which the new germplasms for disease resistance are introduced, but also causes the improvement in both breeding method and breeding strategy for developing tobaccos with disease resistance. For this improved strategy, the utilization of new sources of genetic variations, and the combined improvement of properties of disease resistance, yield and leaf quality are though to be the fundamental objective.

烟草抗病虫基因工程概况

董汉松　张春玲　陈瑞泰

一、植物转基因技术概述

植物转基因技术又称植物转化(plant transduction)技术,可以广义地认为是增加某个物种基因变异范围的一种手段。基于现行植物育种是以好的基因替代不好的基因这一实用目标,基因工程通常只被用来把某个基因引入或添加到不具有这种基因的作物中。而将基因工程作为丰富种内基因变异源和基因调控的手段,虽可能产生比基因引入和添加更为重要的影响,但目前(1990 年本文成文时)研究尚少。

已有大量研究借原生质体的电磁化处理与超声波空泡化处理、DNA 包被颗粒轰击和 Ti 质粒载体等手段,将编码不同性状的等位 DNA 序列转移到了烟草细胞中。自 1983 年 Chilton 对根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)致病的分子学和 Ti 质粒的化学修饰等方面划时代研究[1]以来,Ti 质粒可以被修饰为适于不同的基因构建,成为最普通的基因转化载体。

以 Ti 质粒为载体的基因转移有两个主要步骤:一是嵌合基因的构建,图 1 提出的是一个典型结构;二是嵌合基因向植物细胞的引入和植物转化细胞的体外选择,图 2 是一个被广泛采用的程序。

二、基因转移实例和潜力

1. 病毒基因

(1) 衣壳蛋白基因:自发现植物病毒的交叉保护作用[3]以来,对交叉保护的机制有不同的看法。康良仪等人(1990)[4]认为,带卫星 RNA 的普通花叶病毒(CMV)对烟草的交叉保护,可能是因为卫星 dsRNA 间接地抑制了后攻 CMV 的 RNA 合成或包壳过程;也有人认为诱导毒株的衣壳蛋白对挑战后攻毒株去衣壳作用的抑制起主要作用[5]。到目前为止的抗病毒基因工程主要是根据后一种假说进行的。

对编码 TMV. CMV 等衣壳蛋白的基因已有完全的序列分析,并成功地合成了其 DNA 互补序列。Bevan 等(1985)[6]构建了如图 1 所示的嵌合基因,其中的结构基因是与 TMV 衣壳蛋白基因完全互补的 DNA 链;嵌合基因转入烟草后,转化植株可以合成衣壳蛋白,并表现出交叉保护作用。Powell Abel 等(1986)[7]构建了一个类似的嵌合基因,烟草转化植株的交叉保护作用表现出浓度-时间效应,即后攻毒株接种浓度高时,发病时间就早;接种浓度低时发病就晚。Yamaya 等(1988)[8]将 TMV 的温和番茄毒株基因组的 cDNA(coplementary DNA)拷贝链转入烟草,转化植株也可发生交叉保护,表明整个毒性基因序列的转化同样具有抗病作用。

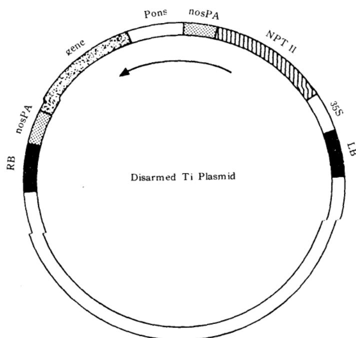


图 1 一个常用的嵌合基因构建模式(引自 Wernsman,1990)

Fig. 1 A typical recombinant gene construction for plant transduction

注:LB、RB,嵌合基因的边端序列;35S,启动子,来自花椰菜花叶病毒(CaMV);NPT Ⅱ,新霉素磷酸化转移酶Ⅱ(N^+),选择标记;nos PA,nopaline 合成酶腺苷化信号,终止子;Pnos,nopaline 合成酶,结构基因插入序列的启动子;gene,目的基因。

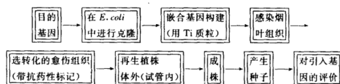


图 2 以 *Agrobacterium* 作载体向烟草转移一个基因插入序列的普通程序

Fig. 2 Procedure of A. tumefaciens-mediating transduction of plants

也有研究试图把多种病毒的衣壳蛋白基因构建在一个嵌合基因中,转化烟草以获得对多种病毒的抗性。美国孟山都公司将 TMV 和马铃薯 X 病毒(PVX)衣壳蛋白基因结合到如图 1 类似的同一个嵌合基因中,转化烟株的交叉保护有 3 种情况:①对 TMV 和 PVX 同时表现低抗;②抗 TMV 不抗 PVX;③抗 PVX 不抗 TMV(私人交流,1991)。表明不同病毒衣壳蛋白基因的表达存在相互制约关系。

烟草转基因植株的抗病性具非专化性特征,表现有二:一是烟草可以接受多种病毒衣

壳蛋白的编码基因，包括TMV、CMV[9]、PVX[10]、三叶草花叶病毒(AMV)[11]、大豆病毒[12]以及烟草弹状病毒[13,14]；二是由于同一组群的病毒其衣壳蛋白在很大程度上存在氨基酸序列的一致性，因此，一种病毒衣壳蛋白基因的转化植株可以对这种病毒的不同株系和同组群的其他病毒表现交叉保护。Stark 和 Beach(1989)[12]将大豆花叶病毒衣壳蛋白基因转入烟草，转基因植株可同时抵抗 PVY 的侵染。

上述研究表明，转基因烟草抗病毒能力的表达强度和持久性，仍是这一基因工程有效性的限制因素。对衣壳蛋白包装不同病毒后可能引起的传染途径和寄主范围的改变等潜在危险，目前也引起了人们的注意。人们正试图通过对启动子序列、寄主基因型以及结构基因在染色体上的插入位点等调节，来解决以上问题。

(2) 人α干扰素基因：动物机体受病毒侵染后，在抗体形成前可以产生干扰素。这是一种(类)低分子、对酸和热稳定的蛋白质，对动植物病毒具广泛的抑制活性。人体α干扰素是其中之一，由人白血细胞产生，在细胞水平上表现抑病毒活性[15]；涂抹烟叶或注射烟茎均可使烟草获得对TMV的抗性[16]。将它的编码基因按类似于图1的基因构建(选择标记为氨卞抗性)转入烟草，转化植株可以合成人α干扰素，同时对TMV表现抵抗(李全义，1990，博士学位论文，南京农业大学)。

2. 来自真菌和细菌的基因

包括编码致病毒素和抗菌等物质的基因，对前者的利用是根据病原真菌和细菌对自身毒素的自我保护机制而设计的。产毒素病原菌拥有某种化合物的编码基因(SP-DNA)，这种化合物保护产毒素病原菌不受它所产生的毒素的为害。SP-DNA 一旦转入植物，转化植物便可获得抗毒素能力。

(1) 除草剂 bar 基因：自然界70%以上的抗生素由链霉菌(*Streptomyces*)产生[17]。其中*S. hydroscopicus*产生的二丙氨磷酚(bialaphos)是一种抗生性除草剂，它由2个L-丙氨酚分子和一个磷酸化三酚(PPT)组成，PPT是L-谷氨酸的类似物[18]。Bialaphos 被肽酶分解释放出PPT，PPT对谷氨酸合成酶有抑制作用；如果这种抑制作用发生在植物体内，就会造成NH_3的积累而引发组织坏死[32]。*S. hydroscopicus* 拥有 bar 基因，它编码一种乙酰转化酶，此酶在该菌 bialaphos 产生和自身保护中起双重作用[19,20]。有人[2]设想将 bar 基因引入烟草，可使烟草既合成这种除草剂，又保护自身不受为害。

(2) 细菌素编码基因：多种动物病原细菌与植物病原细菌均可产生细菌素(bacin)。Bacin 对与产生菌近缘的菌株有专化性抑制作用，多为核外基因控制，这类基因载体极易丢失[21]。Kado(1976)[22]曾提出一个基因构建模型，纳入多种来源的 bacin 编码基因，包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)等动物病原细菌和草生欧氏杆菌(*Erwinia herbicoli*)、青枯假单胞菌等植物病原细菌的 bacin 基因，用Ti质粒作载体转入烟草，由此克服 bacin 基因易于丢失的缺陷，并使转化烟株获得对多种病原细菌的抗性。但目前的研究仍限于对 bacin 及其作用的分析和 bacin 基因的分子学方面[23-25]。

(3) 解烟草毒素的 ttr 基因：烟草野火菌产生的烟草毒素(tobaxin)是一种二肽物，由烟草毒素β-内酰胺(tata)和丝或苏氨酸组成[26]。植物体内的某种肽酶分解烟草毒素释放出 tata，tata 抑制谷氨酸合成酶的活性，使NH_3积累而引致野火型组织坏死[27]。Anzai 等(1989)[28]已完成了从病原菌(*P. syringae*)抗毒素基因(ttr)的检测、克隆到转化烟草的全

部工作。图3是ttr定性和克隆过程的示意图，然后将ttr中700bp的片段用与图1相似的嵌合基因转入烟草。转基因植株具有乙酰化转录作用和抗病菌与病菌毒素的能力。

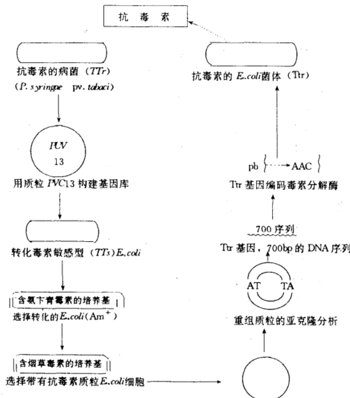


图3 Ttr基因检测和克隆过程示意图（据Anazi等，1989绘）
Fig. 3 Diagram of cloning and subconing the toba-toxin resistant gene from *P. syringae* whieh produces and self-tolerat the toxin

（4）来自细菌的除草剂抗性基因：溴化硝基苯（bromoxynil）类除草剂用于禾本科作物田间专化性地杀灭双子叶杂草；禾本科植物体内的硝酸酶有解毒作用，而双子叶植物则缺少这种解毒机制[29]。Pelissier等（1990）[29]从臭鼻杆菌（*Klebsiella ozaenae*）细胞中克隆出了硝酸酶的编码基因，并以根癌土壤杆菌为介体转入烟草，转基因烟株表现出对溴化甲基苯的解毒能力。

（5）抗虫基因：苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*）产生的昆虫毒素之一，类芽孢蛋白质晶体（PPC），由Bt基因编码。对Bt基因及其编码的蛋白PPC的分子生物学已有相当深入和全面的研究，包括Bt基因克隆、序列分析以及PPC的氨基酸序列分析与人工合成等。

Bt基因的全部序列和部分序列分别是被插入图1所示嵌合基因的35S启动子与终止子nosPA之间，以Ti质粒为载体分别转入番茄和烟草。Fischoff等（1987）[30]测定表

明，转基因植株对3种难防治的害虫表现抗性。目前，分子生物学家试图找到一种伤口诱导性启动子序列，以取代来自CaMV的35S启动子，这样可以克服35S的组成型表达特征所导致的抗虫强度低和昆虫对这种引入抗源的抗性等问题[31]。

总之，可以用来改善烟草和其他作物抗病虫、尤其是抗病性的基因来源非常广泛，例如植物编码诱导性蛋白质和糖蛋白、包括PRP和HRGP的基因，控制木质化及植物保卫素合成中多种酶的基因，3种已克隆的抗病基因，真菌控制激发子和它的传导性的基因等等，都在被认为有利用潜力的目的基因之列。但是，仅在几年的时间内人们就发现，基因工程离达到实用目标的距离并不像人们最初期望的那样理想，主要问题是对外源基因在转化植株中的表达调控还缺乏了解，这也是近年分子生物学研究的热点之一[33]。例如，以PRP的第一组中PR-1a编码基因进行的转化表达，其意义更多地在于对基因表达调控机制的了解，而不是防治病害的实用目的。

参 考 文 献

[1] Chilton, M. D., Sci. Amer, 1983, **248**: 50－59.

[2] Wernsmen, E. A., CORESTA Information Bulletin, CORESTA Symposium 1990, Kallithea, Greece, 1990, 55－84.

[3] Mckinney, H. H. J., Agri. Res., 1929, **39**: 557－578.

[4] Kang, L. Y. et al., Bulletin of China Tobacco Society, 1990, **2**(2): 26－35.

[5] Sherwood, J. L., Fulton, R. W. Virology, 1982, **119**: 150－158.

[6] Bevan, M. W. et al., EMBRO J., 1985, **4**: 1921－1926.

[7] Powell Abel, P. et al., Science, 1986, **232**: 738－743.

[8] Yamaya, J. et al., Mol. Gen. Genet., 1988, **215**: 173－175.

[9] Guozzo, M. et al., Bio/Technol., 1988, **6**: 549－557.

[10] Chaleff, R. S., Ray, T. B., Sciece, 1987, **223**: 1148－1151.

[11] Loesche-Fries, L. S. et al., EMBRYO J., 1987, **6**: 1845－1851.

[12] Stark, K. M., Beachy, R. N., J. Cell Biochem., 1989, Suppl., **15D**: 334.

[13] Van Dun, C. M. P., Bol, J. F., Virology, 1988, **167**: 649－652.

[14] Van Dun, C. M. P. et al., Virology, 1987, **159**: 299－305.

[15] Wang, J. S., Lui, D. J., Advances of Biological Engineering in Nanjing Agricultural University. Publication of Nanjing Agric. Univ. Nanjing, China, 1990.

[16] 李个义等，病毒学报，1989，**5**(3)：274－276。

[17] 中国科协学会工作部主编，学术活动纪要选编，1989，212。

[18] Murakami, T. et al., Mol. Gen. Genet., 1986, **205**: 42－50.

[19] Thanutong, P. et al., Theor. Appl. Genet., 1983, **66**: 209－215.

[20] Kumada Y. et al., J. Antibiot., 1988, **41**: 1838－1845.

[21] Vidaver, A. K., Plant Dis., 1983, **67**: 471－475.

[22] Mount, M. S., Lacy, G. H., Phytopathogemic Prokaryotes, Vol. 1. Academic Press, New York, London, 1982.

[23] Xie, D. X. et al., Acata Microbiol. Sinica, 1989, **29**: 284－292.

[24] Szalay, A. A. et al., Molecurlar Genetics of the Bacteria-Plant Interaction. Cornell Univ, 1985.

[25] Zhang, J. H. et al., Bulletin of China Tobacco Society, 1990, **2**(2): 85－93.

[26] Braum, A. C., Phytopathol., 1955, **45**: 459－464.

[27] Stewart, W, Nature, 1971, **229**: 174－178.

[28] Anzai, H. et al., Mol. Gen. Genet., 1989, **219**: 492－494.

[29] Pelissier, B. et al., CORESTA Information Bulletin, CORESTA Symposium, 1990, Kallithea, Greece, 1990, 148.
[30] Fishchoff, D. A. et al., Bio/Technol., 1987, **5**: 807—813.
[31] Logemann, J., Schnell, J., Mol. Gen. Genet., 1989, **219**: 81—88.
[32] Shibano, Y. et al., Gene, 1985, **34**: 243—251.
[33] 陈章良，植物基因工程研究，北京：北京大学出版社，1993。

INTERESTING GENES USED IN GENETIC ENGINEERING FOR DISEASE AND INSECT RESISTANCE IN TOBACCOS

Dong Hansong, Zhang Chunling and Chen Ruitai

Establishment and improvement of technology of plant genetic engineering are considerably contributed by biochemical modification to Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*, studied by M. D. Chilton (1983)[1], which makes it possible to improve the Ti plasmid for inserting any target genes of any sources. This has brought about noticeable advances in tobacco genetic engineering for enhancing disease and pest resistance only in several years since 1983.

The target genes have been introduced or are greatly potential to be introduced into tobacco are almost of any sources. They include: ①genes from a plant (or cultivar) for introducing another, such as those encoding pathogenesis-related proteins; ②various anti-virus genes from viruses, such as genes for the coat proteins and anti-sense RNA; ③ the α-interferon gene from human body, which can be induced by virus infection to produce the compound with function of countering different viruses; ④fungal genes for self-resistance to toxin produced by themselves and acted as pathogenicity factors, like those for the host specific toxins, and ⑤various of bacterial genes for given roles; the examples include: the enzyme gene of *Pseudomonas syringae* for protecting the bacteria from taboxin by inactivating the toxin which is a determinant of tobacco wild-fire, DNA sequences encoding bacteriocines, chitinases and β-1,3-glucanases, and the famous Bt gene from *Bacillus thuringiensis*. It is expected that effective utilization of these interesting genes bring about effective disease and pest control and that this purpose be conditioned by the studies on genetic regulation in transgenic plants.

第三部分　烟草赤星病：作为一个研究体系的基本研究

烟草赤星病体系中的寄主-病菌相互作用

董汉松　刘爱新

一、研究的背景和意义

烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)是一个生物学和病理学性状都有明显地理分化的种群，国外对此已有许多较早的研究[1]，但很难被套用来分析国内赤星病持续严重发生在寄主-病原物互作上的原因，包括寄主品种抗病结构和地理布局、菌源组成和地理分化及它们之间在中国各种各样的环境条件下的互作对病害流行的影响，都关系到病害控制中品种选用和布局、抗病育种中的抗源选择、其他治理措施的使用及效果。这是我们近年研究的内容之一。

从世界范围看，目前对赤星病的研究在3方面显示积极意义：①病菌AT毒素的作用及其分子生物学[2]；②寄主-病菌分子和群体互作及据此设计病害控制策略和途径；③在世界范围内寻找寄主抗病基因源[3]。我们的研究主要集中在第二方面，以下是对研究结果的简要总结。

二、研究体系和测定技术的建立

病菌致病性和寄主抗病性可以用3个测定体系进行研究：在幼苗上，用孢子悬浮液悬滴接种后诱发病害(幼苗接种体系)；用孢子悬浮液接种离体叶片(离体叶片法)；用AT毒素浸根，观察根系和叶部病变(毒素渗根法)，它们在致病性和抗病性的鉴定上都很吻合。有相当一部分工作是关于如何根据研究需要获得不同的接种体及测定中的条件控制。

三、分子和细胞互作

1. 分子互作

从结构组分上看，病菌孢子是侵染和致病的一个主要接种体，它要经历3个阶段才能完成致病过程。首先是接触阶段，包括孢子和萌发后的芽管对烟草叶面的附着，是一个显示接触识别的过程。病菌的扩散性吸附素(adhesin)在孢子与寄主细胞的联结中作为中间物(媒介)起作用，定论吸附素是参与接触识别的病菌识别子需要两方面的证据：①它的作

用必须有特异性，包括菌株间和品种间差别及它的产生量和作用程度与致病作用的相关性；②必须在烟草上发现它的受体分子，即寄主的识别子，并证明二者具有可以测定的结构互补和互为抗原持性[4]。对前者，我们发现病菌弱毒株产生吸附素的能力明显低于强毒株。对后者，还有待按两种思路加以研究：①吸附素作为一种扩散性分子，它的受体分子既可能在烟草细胞壁上，也可能在细胞膜上；②在烟草诱导抗性发生中有激发子作用的另一种病菌组分，即病菌细胞壁结合分子，也必然在接触阶段起作用，它的受体更可能在烟草细胞壁上。

接触后依次是侵入阶段和扩展阶段，致病作用的分子组分主要有二：一是细胞壁降解酶(CWDE)，它们在强、弱毒株间无明显的、一致性的差别，看来主要是一类基本亲和性因子(概念见文献[5])，有助于病菌在寄主上的定殖和扩展，弱毒株的定殖和扩展在程度和组织范围上都是有限的，所以这些酶对引发坏死斑的快速形成不是唯一的或重要的决定因子；二是AT毒素，看来是引发病斑快速形成的决定因子，在强、弱素株间差别明显，弱毒株产毒素的能力很低或完全丧失。据前人的研究，AT毒素作为配体与烟草细胞膜上它的受体发生分子识别，引发一系列反应，最终导致寄主坏死斑的形成。烟草的受体分子用生化抑制法进行测定，证明是含硫的蛋白质，但尚未从细胞膜上分离出来，对其分子结构和生化特性等还缺乏了解。

2. 细胞和组织上的互作

从分子互作到细胞互作，应该是按两条途径发生的：第一条是表面分子识别引发的细胞互作：①吸附素等中介分子↔烟草细胞壁上的受体分子→②病菌-寄主细胞联结→③CWDE-寄主细胞壁上的底物。第二条途径是AT毒素作为识别因子的作用：①毒素↔它的受体子→②寄主膜上反应→③寄主细胞上的反应(膜透性改变等)。

第一条途径步骤③之后是病菌在组织内的扩展，在接种的叶片上，病菌可以穿过叶片在接种点背面长出菌丝，但随后寄主的反应因病菌菌株的不同而不同，强毒株接种引起特征性坏死斑的形成，而在弱毒株接种的情况下，坏死斑很小或不形成。强、弱毒株间明显的差别是产生AT毒素的能力；在第二条途径中，步骤③之后是细胞坏死、组织坏死及其扩展，这是一个快速和强烈的过程。

因此，第一条途径的作用主要是帮助病菌建立基本亲和性，使它能在寄主体上定殖并生存；第二条途径主要导致寄主发病。一般认为AT毒素是病菌附着到寄主表面后在孢子萌发和芽管形成的过程中产生的，所以第一到第二条途径在互作的总时序上是一个前、后过程。

四、群体互作与病害流行和控制

对这方面进行研究的目的是试图了解：①赤星病近15年来持续大发生的原因；②我国的赤星菌菌源和品种抗病资源，主要是前者；③寄主-病菌群体互作的表现及其与病害控制的关系；④赤星菌生物学和病理学特性地理分化的总的表现；⑤已实行的病害治理措施(如杀菌剂的使用等)对病菌、病害和病害有效治理的影响等。

1. 群体互作的表现与病害流行

群体互作的表现主要有两方面：①在烟草抗病品种群体上，以及在环境因素不利于病害流行的条件下，病菌强致病力菌株发生（所占）的频率（比例）高；而在感病品种群体上及有利于病害流行的条件下，中、弱致病力菌株发生的频率高；②病菌与寄主在病害传播中的接触频率，是致病力分化和病害严重发生的主要原因，这首先是因为赤星菌可以靠气流广泛传播，再加上中国烟区幅员辽阔、环境条件各种各样、同时没有形成适应不同地理条件的品种体系。

病菌致病力分化一旦在自然互作条件下形成，便显示一定的稳定性。几项室内测定表明，病菌生物学性状和致病力在菌种保存和人工培养、接种过程中经较长时间不变，一是没有发现弱致病力菌株致病力变强的情况，二是强致病力菌株在培养过程中致病力减弱不明显，但致病力减弱的现象是肯定的。在自然条件下，弱致病力菌株当条件不利、并与抗病品种群体互作时，存在致病力增强的可能，这需长时间的追踪观察。

在计算机分类中，我们按以下性状对病菌作了分群：①综合分群：是病菌生物学、病理学特性、互作关系及各种生态因子作用的结果，使用的性状有病菌的生物学、致病力、营养利用、形态特征、抗药性、对抗生素的敏感性等；②形态特征的分群，反映了真菌学特性的分化；③抗药性分群，主要指示化学防治的负作用（作者待发表资料）。

2. 群体互作的分化

群体互作的分化因观察视点的不同而有不同的表现，我们首先根据致病力的组成及不同烟区长期栽培的品种的抗病性、主要气候因子的影响，将病菌致病力分成 3 个地理分布型（表 1），它指示不同烟区应该采取不同措施以克服病菌的致病性。

表 1　中国烟区赤星病菌的地理分布型

Table 1　Types of geographical distribution of tobacco brown spot pathogen in China

地理分布型	烟　区	主要气候特征
强致病力型	广东、吉林	极端温、湿
中致病力型	四川、湖北、安徽、山东、陕西	适宜温、湿
弱致病力型	福建、河南、湖南	适宜温、湿

3. 病害控制实践的主要负作用

从我国的实际情况看，烟草生产和病害控制措施对这种地理分布型形成中的作用都是消极的，主要表现有二：一是引进品种“当家”、品种优质但不抗病、而且常常连年并连片种植；二是带菌病残体的广泛存在。其他病害控制措施的影响也是消极的，主要是化学防治带来的抗药性（表 2），而对抗生素的抗性除了药理上共知的机制外，也是防治细菌病害而造成抗药性扩散程度的指示。从赤星病化学防治的实践来看，抗药性的广泛发生有 3 个原因：①现阶段的大量用药，如菌核净；②历史上用药的影响，如退菌特、多菌灵，指示了病

菌抗药性的稳定遗传；③大农业化学防治的影响，即许多杀菌剂不是被用于防治赤星病，但当使用到其他作物上以后，在农业生态大系统中对各种作物的各种病原真菌都是胁迫抗药性产生的因子，在此，赤星菌只是一个指示。

表 2　赤星菌抗药性发生率

Table 2　Fungicide resistance of tobacco brown spot pathogen in China

杀　菌　剂	抗药性菌株(%)	杀　菌　剂	抗药性菌株(%)
退菌特	57.1	敌克松	13.5
可杀得	7.6	福美砷	29.4
速克灵	73.4	甲基托布津	12.9
代森锌	0	福美双	35.3
炭疽福美	75.9	甲霜灵	6.5
恶霜灵锰锌	1.8	多菌灵	11.8
代森锰锌	8.8	抗枯宁	5.3
朴海因	68.8	菌核净	54.7
百菌清	41.8		

注：测定全国各地的 170 个菌株。

五、结　　语

以上讨论的目的和意义主要有两方面。第一，为烟草诱导抗性和利用途径的研究提供病理基础，要点是：①接触识别导误是诱导抗性发生的机制之一；②AT 毒素作为接触后识别因子在抗病性诱导中的作用及诱导抗性利用的体细胞无性系变异途径；③吸附素等作为激发子的作用与诱导抗性直接利用的途径；④群体互作分化作为弱毒株发生和用作抗性诱导因子的基础；⑤从激发子作为抗性诱导的首端出发的有关机制，如 PRP 的发生机制的研究，对此种种，详见本书有关章节。

第二，从群体互作的分化和病害控制的消极方面，警示一种有效、无公害治理对策的紧迫性，诱导抗性的利用正是被期望适于此目的。需再次强调的是，赤星菌源的泛滥和抗药性的广泛产生对作者虽是老生常谈[6,7]，但病害控制实践还有待足够重视。

参 考 文 献

[1] Lucas, G. B., Diseases of Tobacco (3rd ed.). Raleigh, NC: BCA, 1975, 267－296.

[2] Yoder, O. C., Nishimura, S., Host－Specific Toxins. Tottori: Tottori Univ. Press, 1989.

[3] CORESTA, Inf. Bull., Symp. 1990. Kallithea, 1990, 55－84, 179.

[4] 董汉松，植物识别子与病原细菌识别子间的互作，植物生理学通讯，1991，**27**：391－396。

[5] Gabriel, D. W., The genetics of plant pathogen population and host parasite specificity. In Plant-Microbe Interactions: Molecular and genetic Perspectives (Kosuge, T., Nester, E. W., eds.). New York: Macmillan, 1989, **3**: 343－379.

[6] 董汉松、王智发，烟草侵染性病害防治面临的难境与对策，中国烟草，1990(2)：10－13。

[7] 董汉松、卢培秀、杨合同，根据植物-病原物互作控制烟草赤星病的途径，山东科学，1993，**6**(2)：1－9。

INTERACTIONS BETWEEN THE HOST AND PATHOGEN IN TOBACCO BROWN SPOT PATHOSYSTEM

Dong Hansong and Liu Aixin

This paper reviewed the studies on tobacco brown spot, mainly the research results of the molecular, cellular and popular interactions between the host and pathogens. The interactions were discussed in relation to the disease control, especially for their significace to research and practice of induced tobacco resistance to the disease.

烟草赤星病菌致病力测定方法的研究

董汉松　王智发

在对烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)致病性的研究中,许多研究者试图改善病菌的侵染条件以获得成功侵染,方法之一是改善接种物状况[1]和加强接种体对叶面的亲合能力[2,3]。但对如何解决烟草生育期过长而影响一定时间内试验的重复性问题,尚缺乏研究。本文报道用两种方法测定病菌致病力的研究结果(1988—1989年进行)。

一、材料与方法

1. 供试植物材料

在烟草(*Nicotiana tabaccum*)的两个品种,G80和G140上进行测定。先于温室(20—25℃)内在27×53cm的瓷盘中育种,然后依不同处理的要求移植幼苗。

2. 供试菌株

测定的菌株包括烟草赤星病菌的33个菌株、茄子和番茄早疫病菌(*A. solani*)各1个菌株,以及分别来自菜豆、黄瓜、大白菜和小麦的共4个分离物(*Alternaria* sp.),菌株来源等情况见表1。

3. 离体叶片接种法

育苗后45天移植到直径为12cm的盆钵中,盆钵内先装入灭菌土。移栽后于20—25℃温室内生长50天,至品种G80苗高10—15cm、9—10叶和G140苗高10—15cm、8—9叶,各选40株整齐一致的幼苗,每苗各取第5—8真叶共4片,叶片大小为3.5—6.5×5—10cm。将各株的各叶位离体叶片混匀后随机置放于37×53cm的瓷盘内,瓷盘先经紫外线杀菌(50cm,20分钟)并已垫四层灭菌纱布、纱布亦先用灭菌水浸湿,将离体叶置纱布上。然后按悬滴法接种叶片上表面,每叶10—12滴。接种后用经75%酒精消毒的塑料薄膜将盘口封严并置于25℃±温箱内培养。

测定中共接种39个菌株(表1),各菌株均在马铃薯琼胶培养基斜面上于25℃±下生长28天,用灭菌过的1%的葡萄糖溶液配制20 000—30 000孢子/ml的孢子悬浮液用于接种,并以1%葡萄糖溶液同样接种作对照;每菌株各接3张叶片作为3次重复,同时各另设一个对照。

4. 幼苗接种

育苗后45天移植幼苗进行沙培生长,沙培方法是:将上口内径为2.8cm,高为12cm的黑色塑料管内注满沙子(约24目),在注入沙子时将幼苗栽于其中;然后将栽有幼苗的

塑料管置于直径6.5cm、高10cm的玻璃瓶内，瓶内加事先配制的Hoagland培养液[4]至塑料管的1/3高度处，最后将玻璃瓶置24－26℃的恒温室内生长至苗高10－15cm时进行接种。共接种24个菌株(表1)，按前法制备孢子悬浮液(50 000孢子/ml)并接种，每菌株各分3组，每组接种3株苗，并用1%葡萄糖液接种第4株苗作对照。接种叶片选第5、6真叶，每叶接种10－12滴。接种后在保湿桶内密闭保湿72小时(24－26℃下)尔后移出并继续培养。

表1 供试菌株的来源与性状

Table 1 Sources and properties of tested strains

菌　株	菌株代号	所属种学名	分离寄主	采集地点	试验用途
TBA1	1	*Alternaria alternata*	烟　草	福建　龙岩	离体叶片法(Ⅰ)
TBA2	2	*A. alternata*	烟　草	安徽　凤阳	Ⅰ
TBA3	3	*A. alternata*	烟　草	山东　诸城	Ⅰ
TBA4	4	*A. alternata*	烟　草	山东　安丘	幼苗接种(Ⅱ)
TBA5	5	*A. alternata*	烟　草	山东　平邑	Ⅰ，Ⅱ
TBA6	6	*A. alternata*	烟　草	山东　泰安	Ⅰ，Ⅱ
BBA1	7	*Alternaria* sp.	菜　豆	山东　泰安	Ⅰ
TBA8	8	*A. alternata*	烟　草	山东　莒县	Ⅰ，Ⅱ
TBA9	9	*A. alternata*	烟　草	福建　龙岩	Ⅰ，Ⅱ
CCA1	10	*Alternaria* sp.	黄　瓜	山东　泰安	Ⅰ，Ⅱ
SA1	11	*A. solani*	番　茄	山东　枣庄	Ⅰ，Ⅱ
TBA10	12	*A. alternata*	烟　草	山东　临朐	Ⅰ，Ⅱ
TBA11	13	*A. alternata*	烟　草	山东　安丘	Ⅰ，Ⅱ
TBA12	14	*A. alternata*	烟　草	山东　沂水	Ⅰ，Ⅱ
TBA13	15	*A. alternata*	烟　草	山东　安丘	Ⅰ，Ⅱ
TBA14	16	*A. alternata*	烟　草	山东　沂水	Ⅰ，Ⅱ
SA2	17	*A. solani*	茄　子	山东　平阴	Ⅰ，Ⅱ
TBA15	18	*A. alternata*	烟　草	云南　玉溪	Ⅰ，Ⅱ
TBA16	19	*A. alternata*	烟　草	山东　临朐	Ⅰ
BPA1	20	*Alternaria* sp.	大白菜	山东　泰安	Ⅰ
TBA17	21	*A. alternata*	烟　草	山东　临朐	Ⅰ，Ⅱ
WA1	22	*Alternata* sp.	小　麦	山东　泰安	Ⅰ
TBA18	23	*A. alternata*	烟　草	山东　临朐	Ⅰ，Ⅱ
TBA19	24	*A. alternata*	烟　草	云南　玉溪	Ⅰ
TBA20	25	*A. alternata*	烟　草	山东　益都	Ⅰ，Ⅱ
TBA21	26	*A. alternata*	烟　草	山东　平邑	Ⅰ
TBA22	27	*A. alternata*	烟　草	山东　平邑	Ⅰ，Ⅱ
TBA23	28	*A. alternata*	烟　草	山东　平邑	Ⅰ
TBA24	29	*A. alternata*	烟　草	山东　平邑	Ⅰ，Ⅱ
TBA25	30	*A. alternata*	烟　草	山东　平邑	Ⅰ，Ⅱ
TBA26	31	*A. alternata*	烟　草	山东　平邑	Ⅰ
TBA27	32	*A. alternata*	烟　草	山东　平邑	Ⅰ，Ⅱ
TBA28	33	*A. alternata*	烟　草	山东　昌乐	Ⅰ，Ⅱ
TBA29	34	*A. alternata*	烟　草	山东　昌乐	Ⅰ
TBA30	35	*A. alternata*	烟　草	山东　昌乐	Ⅰ
TBA31	36	*A. alternata*	烟　草	山东　昌乐	Ⅰ，Ⅱ
TBA32	37	*A. alternata*	烟　草	山东　昌乐	Ⅰ，Ⅱ
TBA33	38	*A. alternata*	烟　草	山东　昌乐	Ⅰ，Ⅱ
TBA34	39	*A. alternata*	烟　草	山东　昌乐	Ⅰ，Ⅱ

5. 检测

幼苗接种的处理于接种后5天检查发病情况，分别以叶片为单位统计病叶率，并按表2的标准判断单叶发病等级，由此计算病情指数，统计结果取3次重复(3组)的平均值。

离体叶片接种的处理在接种后3天检查两项指标。一是菌丝对叶面的穿透生长能力，即观察菌丝穿透叶面并在接种位点背面生长的情况，按表3的标准进行分级，统计结果取各级的代表值。二是菌株对离体叶的致病力，按表4的标准分级，统计时取各级的代表值。

表2 幼苗人工接种后发病等级的分级标准

Table 2 Criteria for grading brown spot symptoms on tobacco seedlings inoculated with *Alternaria alternata*

等 级	发病情况	代 表 值
0	不发病	0
1	接种叶上接种位点中一半位点发病，病斑不联结	1
2	接种叶上全部接种位点均发病，病斑不联结	2
3	全部接种位点均发病，病斑枯死，枯死斑在少数接种位点间联结，叶片的未接种部分不产生病斑	3
4	1/2以上2/3以下的叶面积枯死	4
5	2/3到全叶枯死	5

表3 离体叶片接种后菌丝对叶面穿透和生长能力的分级标准

Table 3 Criteria for grading penetration and growth capacity of the pathogen's hyphae after the detached leaves inoculated with *A. alternata*

等 级	菌丝穿透和生长情况	代 表 值
0	无穿透，无生长	0
1	接种位点上菌丝生长稀疏不覆盖接种液滴，无穿透	10
2	接种位点正面菌丝覆盖液滴，并在接种位点背面长稀疏菌丝	20
3	叶正面接种位点与叶背面对应部位均长浓密菌丝、各接种位点间菌丝不联在一起	30
4	叶正反两面均长有浓密菌丝，各接种位点间菌丝相联	40

注：处于两等级之间的在上个等级代表值上加5。

表4 离体叶片接种后发病情况的分级标准

Table 4 Criteria for grading brown spot symptoms of detached leaves inoculated with *A. alternata*

等 级	发病情况	代 表 值
0	不发病(与对照同)	0
1	叶片接种部位略退绿，叶尖2cm内黄化	10
2	叶尖3cm内黄化，接种部位呈淡黄晕圈	10
3	整片叶退绿，叶缘2cm内黄化，接种部位生晕斑	30
4	整叶严重黄化，接种部位产生明显的赤星斑	40

注：介于两等级之间的取此二代表值的平均值。

二、试验结果

1. 不同菌株对叶片的穿透和生长

图1表明，对叶片的穿透和在接种位点背面上生长的能力在菌株间的差异表现为组群关系：①无穿透和生长的菌株组，有TBA1、TBA22、TBA23和TBA13等4个菌株；②低穿透和弱生长的菌株组，有21个菌株，其中包括番茄早疫病菌（*Alternaria solani*）的一个菌株和分别来自菜豆、黄瓜、大白菜和小麦的4个分离物（*Alternaria* sp.），其余16个菌株均为烟草赤星病菌。这些菌株表现出很低的叶面穿透和生长能力，代表值仅为5—10；③中强菌株组，其叶面穿透和生长值（代表值）为15—25，有7个菌株，包括茄子早疫病菌（*A. solani*）的一个菌株；④高穿透和强生长的菌株组。为烟草赤星病菌的其余7个菌株，穿透和生长值为30—40。其中以菌株TBA19、TBA24和TBA28穿透和生长能力最强，其值分别为35和40（图1）。

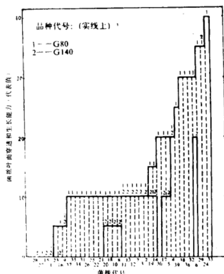


图1　不同菌株在离体叶片测定法中表现的叶面穿透生长能力

Fig. 1　Capacity of hypha penetration and growth given by different strains of *A. alternata* inoculated to detached leaves

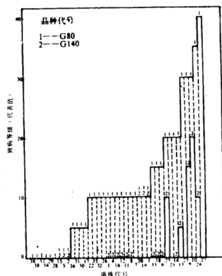


图2　不同菌株在离体叶片测定法中的致病等级

Fig. 2　Grades of brown spot symptoms caused by different strains of *A. alternata* inoculated to detached leaves

另一方面，用21个菌株同时接种烟草品种G80和G140，有11个菌株对这两个品种的叶面穿透和生长值相等，另有10个菌株在G80上较之在G140上的叶面穿透和生长值高5—10（图1）。

2. 不同菌株对离体叶片的致病能力

采用离体叶片法接种，可以保持适宜的湿度条件，并能控制恒定温度。在这种条件下，

接种后两天离体叶即有病变发生，3天可明显看出不同菌株致病力的差异。接种的离体叶片的发病过程是：最初叶尖和叶缘2—3cm内退绿或黄化；继而是接种位点产生中间黄化周围退绿的病斑，并伴有整个叶片的轻度黄化；然后接种位点形成赤星斑，同时伴随着整个叶片的黄化；最后接种位点变成枯死斑，严重者各枯死斑相联而使叶片大部或全部枯死。这一系列不同程度的症状可以发生于同一时间内接种过不同菌株的叶片上，也可以发生于接种了同一菌株的不同叶片上和不同时间内。接种了1%葡萄糖液的对照叶片均不发生病变。

离体叶的发病程度依接种的菌株不同而不同。供试39个菌株中不致病的有9个菌株，致病值(代表值)为5—10的有18个菌株，其中有茄子与番茄早疫病菌的各一个菌株SA1和SA2，以及分别来自菜豆、大白菜和小麦的3个分离物。这些菌株对离体叶片仅表现轻微的致退绿作用。致病值为15—25的有7个菌株，为30—40的有5个菌株。其中以烟草赤星病菌菌株TBA12和TBA22的致病值最高(图2)。此外，在同时接种品种G80和G140的21个菌株中，有15个菌株对G80致病力高10—30个代表值(图2)。

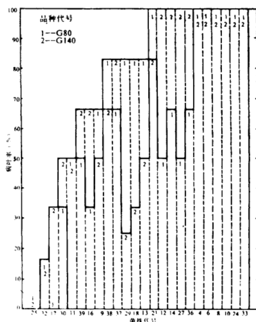
3. 不同菌株对幼苗的致病作用

用烟草赤星病菌和其他来源的分离物共24个菌株接种烟草幼苗，其中同时接种烟草品种G80和G140的有21个菌株，其中包括来自黄瓜的一个分离物。接种后4天即见有赤星病斑发生。而各菌株的对照无病。接种叶片的发病率绘制于图3。一个明显的趋势是，致病力在菌株间的差异表现为发病率从低到高的均匀分布，病叶率50%以下的5个菌株，60—80%的有8个菌株，100%的有11个菌株。其中，番茄与茄子早疫病菌菌株SA1和SA2表现很低的发病率，而来自黄瓜的分离物CCA1表现的病叶率为100%(图3)。比较两个品种可以发现，有10个菌株在G140上较在G80上病叶率为高(图3)。

与病叶率相比，发病程度(病情指数)在菌株间有明显的差异(图4)。这种差异表现为明显的组群关系：①病情指数小于30的有12个菌株，包括SA2；②病情指数为30—50个有7个菌株；③病情指数为60—100的有5个菌株，为烟草赤星病菌的TBA6、TBA8、TBA12、TBA19和TBA28。此外，不同菌株引致发病的病情指数在两个品种上不表现一致的差异。

4. 病菌对离体叶致病力与其对幼苗致病力之间的关系

将供试24个菌株在对离体叶穿透和生长能力、致病等级和对幼苗的致病力(病叶率和病情指数)中的测定值，按从低到高的顺序加以排列，并据各项测定值范围划分从低到高的各5个数值区间(表5)，同时比较24个菌株在4对测定组合中排列次序的差数(表6)，用以表明病菌对离体叶的穿透生长能力与致病力同它们对幼苗叶片致病力之间的关系。比较表明，不同菌株在此二项测定中的值均落入相对等的数值区间(表5，表6)。对幼苗致病的病指与对离体叶致病的病级之间，除5个菌株符合程度低外，其余19个菌株呈一致趋势(表6)。病指与对离体叶的穿透生长值之间，以及对离体叶的穿透生长能力与致病力之间，不同菌株在序列和对等数值区间上的符合程度较低，尤以穿透生长值与致病等级值间的差异较大(表6)。因此，离体叶片法测定的发病等级与接种幼苗后获得的病指间能反应菌株致病力的一致差异，而对离体叶的穿透和能力表现的菌株差异与菌株的致病



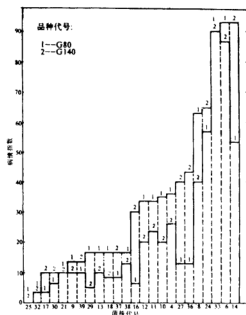


图 3 不同菌株在烟草叶片上引起赤星病的病叶率

Fig. 3 Ratio of diseased leaves of tobacco seedlings inoculated with different strains of *A. alternata*

图 4 不同菌株在烟苗叶片上引致发病的病情指数

Fig. 4 Disease indexes of brown spot on tobacco seedling leaves inoculated with different strains of *A. alternata*

力不相一致。此外,烟草赤星病菌的 5 个菌株,TBA6、TBA8、TBA12、TBA19 和 TBA28 在以上 5 项测定中均表现较高的致病力。而菌株 TBA20 和 TBA27 表现一致的低致病力。

表 5 两种接种法 4 项测定间比较的对等数值区间

Table 5 Grading standard of comparative and equal value ranges comparing different tests following the two inoculating methods

测定	对等数值区间				
	低	中低	中	中高	高
病叶率	0—20	21—40	41—60	61—80	81—100
病情指数	0—15	16—30	31—60	61—80	81—100
离体叶穿透生长值	≤5	5(不含)—10	15—20	25—30	35—40
离体叶致病值	≤5	5(不含)—10	15—20	25—30	35—40

三、讨 论

Norse(1973)试验指出,赤星病菌对烟草叶片的穿透是一种有重要病理学意义的早期现象[2],其重要性之一是作为侵染的重要方式起作用[5],但对穿透与致病力间的关系尚

无明确表述。本文的结果表明病菌对寄主叶片的穿透生长能力与致病力的强弱之间不存在定量的相关性，说明穿透只是病菌侵染和致病的一个环节。而研究病菌的叶面穿透能力具有两方面的意义。首先可据此对病菌不同菌株或不同分离物的致病力进行定性测定。据Spurr 和 Welty(1972)报告[6]，在烟草叶面上至少有 18 种附生物附生生长，它们由于不能穿透叶面而不引发生任何症状。第二，Dean 和 Kuc(1987)研究指出，在系统性诱导抗性的测定中，被诱导保护过的植株叶片对挑战菌株的穿透抵抗力高近 10 倍[7]。因此，菌丝对叶面的穿透能力可作为诱导抗性的指标之一。

表 6　不同测定组合中供试菌株排列次序间的差值

Table 6　Differential numbers of orders ranging tested strains in different test combinations

菌　株	菌株代号	在不同测定组合中的序列差数			
		病叶率-病指数	病指-穿透生长值	病指-离体叶病级	离体叶病级-穿透生长值
TBA4	4	1	2	5	4
TBA6	6	2	3	1	2
TBA8	8	1	12	5	7
TBA9	9	1	3	15	22
CCA1	10	5	8	6	17
SA1	11	1	5	1	5
TBA10	12	1	2	1	2
TBA11	13	3	0	11	12
TBA12	14	8	11	2	9
TBA14	16	6	10	1	11
SA2	17	0	14	4	5
TBA15	18	2	3	5	11
TBA17	21	0	1	13	15
TBA19	24	2	2	2	3
TBA20	25	0	4	16	15
TBA22	27	1	16	6	23
TBA24	29	3	13	4	16
TBA25	30	0	10	3	5
TBA27	32	0	17	7	9
TBA28	33	2	2	7	10
TBA31	36	1	0	14	12
TBA32	37	1	7	8	1
TBA33	38	2	6	10	16
TBA34	39	1	11	6	16

本文的另一项结果表明，病菌对离体叶的致病力与对幼苗叶片的致病力之间存在定

量的一致性，说明在致病力测定中离体叶片法可在一定范围内代替幼苗接种法。Stavely和Slana[8]指出，接种老叶较接种嫩叶易获成功。但本研究不仅在幼苗幼叶上接种获得了菌株间的差异性，而且证明离体叶片测定法也可以明显表现菌株间致病力的差异。离体叶片法不仅少受烟草生育期的限制，而且易于控制温湿条件。因此认为，离体叶片法不失为测定病菌致病力的一个简便方法。

参 考 文 献

[1] Spurr, H. W. , Tob. Sci. , 1973, **17**: 145－148.

[2] Norse, D. , Ann. Appl. Biol. , 1973, **74**: 297－306.

[3] Stavey, J. R. , Main C. E. , Phytopathol. , 1970, **60**: 1591－1596.

[4] 潘瑞炽、董愚得，植物生理学(上册)，高等教育出版社，1981。

[5] Lucas, G. B. , Diseases of Tobacco, 3rd ed. , Biol. Consulting Associates, 1975, 267－296.

[6] Spurr, H. W. , Welty, R. E. , Phytopathol. , 1972, **62**: 916－920.

[7] Dean, R. A, Kuc, J. , Physiol. Mole. Plant Pathol. , 1987, **31**: 69－81.

[8] Stavely, J. R. , Slana, L. J. , Phytopathol. , 1971, **61**: 73－78.

STUDY ON METHODS FOR INDENTIFYING PATHOGENICITY OF TOBACCO BROWN SPOT PATHOGEN

Dong Hansong and Wang Zhifa

The pathogenicity of 33 strains of *Alternaria alternata* and 6 strains or isolates from other plants to seedlings and detached leaves was tested in 2 tobacco varieties G80 and G140. The results indicated that the strains tested could be categorized into diffrent groups either dependently on their ability of penetrating detached leaves and growing on them or dependently on their pathogenicity to detached leaves and seedlings. The constantly strong pathogenicity to seedlings and detached leaves was given by strains TBA6, TBA8, TBA12, TBA19 and TBA28, and constantly weak by TBA20 and TBA27. By comparision, consistent trend of pathogenicity of 24 brown spot pathogenic strains was found between inoculating seedlings and detached leaves of varieties G80 and G140 but not between penetrating-growing ability to detached leaves and pathogenicity to seedlings and detached leaves. It was suggested that the method for identifying pathogenicity by inoculating detached leaves be accurate, fast and easy to be controlled.

烟草病原真菌研究中的一种选择分离技术

董汉松　曲建军　王智发

烟草及其他作物的真菌性病害，尤其是根茎病害的病原物分离常受细菌污染。而且由于许多细菌存在于植物组织内[1]，表面消毒并不能把它们杀死；而消毒剂内渗又往往会杀死要分离的目标病原物。因此，如何防止细菌的污染并获得高的病原物检出率，对真菌性病害样本的分离是一个限制性问题。本文报道一项可以解决这一问题的选择分离技术（1989 年进行研究）。

一、材料和方法

1. 供试材料

（1）病原物：烟草赤星病菌（菌株 TBA28）；低头黑病菌（菌株 TC1）；根黑腐病菌（TB1）。

（2）病样：马兜铃茎腐病病样由山东药材学校提供。

（3）植物材料：烟草品种 G140 按以前使用的方法育苗[1]；莱豆幼苗长至 20cm 高时作用接种。

2. 接种与取样方法

赤星病按以前的方法接种烟草并诱发病害[2]后 3 天取样；根黑腐病病菌菌株 TB1 制成 1.0×10^5 孢子/ml 的悬浮液，拌入盆钵中的灭菌土内，栽种烟苗[3]，15 天后取样；低头黑病菌以 4×10^6 孢子/ml 的悬浮液用喷雾法接种莱豆幼苗[4]，待出现病斑后取样。低头黑和赤星病叶均切取大小为 $0.5-1.0\times0.5-1.0$cm 的病斑部位，马兜铃茎腐病和烟草根黑腐病取发病的茎基和侧根，用作分离。

3. 利福平-马铃署琼脂培养基（R-PDA）的制备

利福平胶囊 21 粒加甲醇（100%）100ml，并加入 1N NaOH 至溶解，制成 30 000μg/ml 的原液，置 4℃下备用。PDA[5a]用 0.1mol/L、pH7.0 的磷酸缓冲液配制，倒平板时每 150ml PDA 加 2ml 利福平原液，即成利福平含量为 400μg/ml 的 R-PDA 培养基。

4. 分离方法

将上述 4 种病样分别用两种方示作表面消毒，一是单以 70%酒精消毒 10 秒钟；二是酒精消毒后经灭菌水浸洗，再用 0.1%升汞消毒 30－60 秒钟。消毒后的病样分别置于 PDA 和 R-PDA 平板上，每种病样 4 皿，每皿 2－4 块病组织。然后在 25℃下培养 4 天，检测病原物回收率（100×有病原菌生长的组织块数/检测组织块总数）及细菌和非目标病原

的真菌的污染情况。5种病原真菌按文献[3]的方法加以鉴定。

5. 病菌产孢能力和致病力测定

将赤星病菌分别在PDA和R-PDA培养基上生长21天(25℃),按以前所用方法[2]分别制备孢子悬浮液并接种烟草,诱发病害后按上面所述方法在R-PDA和PDA上回收病原菌,并用回收的病菌回接烟草,如此作13代重复,每代各接种6株烟苗,每株烟苗接种第4、5真叶。各代于诱发病害后检测发病率和病情指数。每代回收时测定病菌在PDA和R-PDA平板上生长时的菌落面积和产孢指数[5a],每代各作6个重复,每重复含2—4块病组织,各代结果取平均值。

二、试验结果

1. 防止杂菌污染的效果

由表1可知,凡是在R-PDA平板上分离的病样均不受细菌污染,其他真菌的污染率只有7.5%。相比之下,在PDA平板上分离的病样细菌污染率为89.4%,非目标病原真菌的真菌污染率为41.3%;同时,由于细菌和非目标病原真菌的严重污染,目标病原的检出率只有25%。说明利福平选择分离技术对各种真菌性病原物分离中防止细菌和非目标真菌的污染,效果非常明显(图1)。

表1 用R-PDA培养基分离5种病原真菌的情况

Table 1 Efficiency of isolating different fungi with the medium R-PDA

病名	病原物学名	分离寄主	病原菌检出率(%)		细菌污染率(%)		真菌污染率(%)	
			PDA	R-PDA	PDA	R-PDA	PDA	R-PDA
烟草低头黑病	*Colletotrichum* sp.	菜豆	0	37.5	75.0	0	0	12.5
烟草赤星病	*Alternaria alternata*	烟草	0	37.5	100	0	6.25	0
烟草根黑腐	*Thielaviopsis basicola*	烟草	0	43.8	72.2	0	100	25
马兜铃茎腐病	*Alternaria* sp.	马兜铃	100	100	100	0	33.3	0
	Fusarium sp.		25	100	100	0	66.7	0
平均			25	63.8	89.4	0	41.3	7.5

2. 利福平选择分离技术对分离程序的简化

按两种方法消毒后在R-PDA上分离的病样,病原物检出率差别明显(表2)。单用酒精消毒的检出率为82.5%,酒精-升汞二次消毒的仅为8.3%。按两种方式消毒后在PDA上培养的病样,由于杂菌的污染(图1),均回收不到目标病原真菌。表明利用利福平选择分离技术可以不进行升汞消毒,从而既可减少目标真菌被杀死的机会而提高检出率,又可

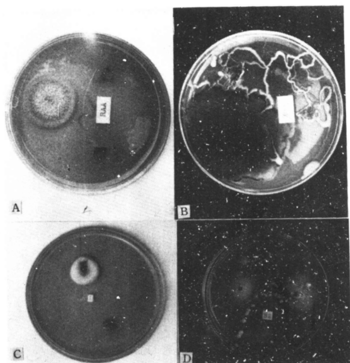


图1 利福平选择分离的效果

Fig. 1 The situation of isolating fungi with R-PDA medium

A. 马兜铃茎腐病菌在 R-PDA 平板上。B. 马兜铃茎腐病菌在 PDA 平板上。

C. 烟草根黑腐病菌在 R-PDA 平板上。D. 烟草根黑腐病菌在 PDA 平板上。

简化分离程序。

表 2 用两种方法消毒在 PDA 及 R-PDA 培养基上分离 5 种病原真菌的检出率

Table 2 Detection of pathogenic pathogens in media PDA and R-PDA

病原菌	酒精消毒		酒精-升汞消毒	
	PDA	R-PDA	PDA	R-PDA
烟草低头黑病菌	0	50	0	25
烟草赤星病菌	0	75	0	0
烟草根黑腐病菌	0	87.5	0	0
马兜铃茎腐病菌	100	10	—	—
Alternaria sp.	25	100	—	—
Fusarium sp.				
平均值	25	82.5	0	8.3

3. 利福平选择分离技术对病菌生物学性状与致病力的影响

连续13代接种-回收的结果表明，利福平选择分离技术对赤星病菌的培养性状和致病力均无影响。从菌落型看，无论在R-PDA还是在PDA平板上生长，病菌均形成黑色近圆形的菌落。气生菌丝高度均为3－4mm。从生长和产孢能力看，产孢指数和菌落面积在13代回收培养中的曲线图形和测定值变化范围，在PDA和R-PDA上呈现一致的趋势，产孢指数均在1－3之间，菌落面积多在10－30cm^{2}之间变化(图2)。致病力也呈现类似趋势，从PDA和R-PDA平板上制备的孢子接种体接种烟苗后，病叶率均为或近100%，病情指数在13代中的图形变化十分一致，测定值变化范围均为25－75，而大多代数则集中在50－60之间(图3)。

对另外4种病原真菌生长情况的观察也表明，利福平选择分离技术同样不影响这些真菌的培养性状和菌落型(图1)。

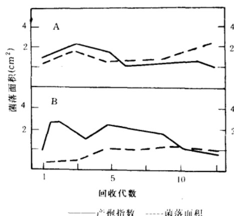


图2 各代回收的病菌在PDA(B)和R-PDA(A)培养基上生长(7天)的生长产孢情况

Fig. 2 Growth and sporulation of *A. alternata* on media PDA and R-PDA

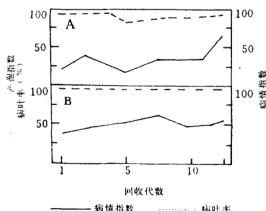


图3 用PDA(B)和R-PDA(A)培养基回收病菌接种烟苗后的发病情况

Fig. 3 Pathogenicityof *A. alternata* recovered with PDA and R-PDA media

三、讨 论

细菌对利福平的抗性可以在逐渐提高该药剂浓度的平板繁殖条件下加以筛选而获得[5b]，并由细菌的染色体基因遗传下来[6]。这种可遗传的抗药性已被广泛用在人工接种条件下的病原细菌学和植物细菌性病害的病理学及生态学等方面的研究中[5b,5c,6,7]。但直接来自自然生态(包括植物体表和体内)的细菌由于缺少这种药剂胁迫条件，因而不具利福平抗性，在含利福平的培养基上不能生长。本文的研究结果表明，利用这一特性而设计的利福平选择分离技术，可以有效地防止各种烟草病原真菌分离中的细菌污染，从而给研究工作提供方便。这种技术在马兜铃茎腐病分离中的选择效应，表明它可以适用于所有植

物真菌등病害的研究，这在疫霉研究中已有采用[5d]。将利福平抗性的应用从细菌性病害研究吸收到真菌性病害研究中，具有多方面的实用意义。

利福平选择分离技术由于不影响病菌的生物学性状和致病性，因而使研究结果具有可比较性和可靠性。另一方面，使用这一技术可以不作第二次消毒，既简化了分离程序，又减少了病样中的病原物被杀死的机会而提高检出率。此外，病原真菌菌株保存过程中也易被细菌污染，此项技术亦可用来纯化菌种。

参 考 文 献

[1] Hayward, A. C., Latent infection by bacteria of plants. Annu. Rev. Phytopathol., 1974, **12**: 87—97.

[2] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病性测定方法的研究，山东农业大学学报，1989，**20**：1—8。

[3] Lucas, G. B., Diseases of tobacco (3rd ed.). NC: BCA, Raloigh, 1975, 143—160.

[4] 陈瑞泰、王智发等，烟草病虫害防治，济南：山东科学技术出版社，1990。

[5a] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌不同菌株在 11 种培养基上的生长产孢能力，中国烟草，1989，**4**：1—9。

[5b] 董汉松，大白菜软腐病菌的根系侵入、潜伏侵染及其检测方法的研究，硕士学位论文，南京农业大学，1985。

[5c] 董汉松，大白菜品种对软腐病抗性的综合评价以及在根系侵染阶段病菌与寄主之间的互作，博士学位论文，南京农业大学，1988。

[5d] 郑小波，福建、浙江、江苏、上海三省一市疫霉种的研究，硕士学位论文，南京农业大学，1987。

[6] Weller, D. M., Seatter, A. W., Rifimpicin-resistant *Xanthomonas phaseoli* var. *fusans* and *Xanthomonas phaseolicola*: Tools for field study of bean blight bacteria. Phytopathol., 1978, **68**: 778—781.

[7] Weller, D. M., Seatter, A. W., Coloniztation and distribution of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in fieled—grown navy beans. Phytopathol., 1980, **70**: 500—506.

STUDIES ON A SELECTIVE ISOLATION METHOD FOR FUNGAL PATHOGENS OF TOBACCO

Dong Hansong, Qu Jianjun and Wang Zhifa

The R-PDA medium was made by adding 400μg/ml rifampicin to common PDA medium and used for isolating 5 species of tobacco pathogenic fungi. By using the medium, the 63.8% of detected frequency of different pathogens was obtained with no contamination by bacteria and as less as 7.5% contamination by nonpathogenic fungi. While the PDA medium as a control gave only 25% detected frequency for pathogens with 89.4% contamination by bacteria. This selective isolation method was able to make the isolating procedures simple. Only sterilization by 70% alcohol without using mercuric chloride gave the detected frequency for pathogens 74.2% higher than double sterilization of alcohol followed by mercuric chloride. Furthermore, no effects on the pathogenicity of the pathogen were brought about by the application of rifampicin in R-PDA medium.

培养条件对烟草赤星病菌生长能力的影响

王智发　董汉松

近年来烟草赤星病在国内各烟区普遍发生，已成为严重影响烟叶产量和质量的叶斑型病害之一[1]。但由于国内对病菌 *Alternaria alternata*(Fr.)Keissler 的生物学及病理学等特性尚未开展研究，因而难以为生产实践提出有效的防治措施。国外的有关研究[2-5]存在混乱和不一致的情况[6]，很难成为国内制订防治措施的依据。本文主要报道关于我国烟草赤星病菌生物学特性等方面的研究结果(1989 年进行研究)。

一、材料与方法

1. 供试菌株

试验先后测定的 13 个菌株是，TBA6、TBA10、TBA12、TBA14、TBA19、TBA20、TBA24、TBA25、TBA27、TBA28、TBA32、TBA33 和 TBA34，分别采自国内不同烟区，并表现强弱不同的致病力[7]；保留于 4℃下的 PDA 斜面上，所有测定均在 PDA 平板上进行。

2. 试验处理和测定方法

(1)生长温度：设 12、16、20、24、28、32、36、40℃共 8 个温度梯度。将供试菌株移至 PDA 平板上，在相应温度下生长 7 天，然后分别计测菌落面积(cm^2)和气生菌丝高度(mm)。每菌株重复 3 次，取平均值。

(2)生长的 pH：以 0.5pH 单位为一梯度间隔、设 2.5—10.5 共 17 个 pH 梯度，分别有醋酸-醋酸钠(pH5.5 以下)和磷酸二氢钠-磷酸氢二钠(pH6.0 以上)缓冲液制备 PDA 平板，按上述进行培养(24℃)和测定。

(3)光照试验：采用 3 种处理：①1 日 24 小时光照(全光)；②12 小时光照、间以 12 小时暗处理(光-暗交替)；③1 日 24 小时暗处理(全暗)。光照条件为 96W 日光灯照射于 30cm 高度；培养与测定方法同上。

(4)菌丝体损伤试验：先将供试菌株在 24℃下的 PDA 平板上生长 3 天(每菌株 6 皿)，每菌株各取 3 皿用挑针损伤气生菌丝，然后与未经损伤的处理一起继续培养到第 7 天，计测菌落面积与气生菌丝高度，取 3 次重复的平均值。

二、试验结果

1. 生长温度

图 1 表示供试菌株中的 4 个代表性菌株在 8 个温度梯度下的菌落面积，图 2 是在相

应条件下的气生菌丝高度，表明病菌生长量-生长温度呈明显的S型曲线。生长的起始温度为12—16℃，最适温度为20—24℃(气生菌丝)和20—28℃(菌落扩展)，最高温度为36℃。在40℃下，所有菌株均表现菌落不生长，但测定表明仍具生活力。另一方面，不同温度下生长量在菌株间的差异也表现出一致的趋势，均以菌株TBA28生长最弱。

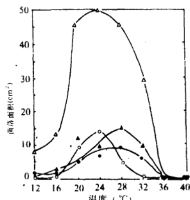


图1 病菌菌落面积-生长温度曲线

Fig 1 Colony area of different strains of *Alterñaria alternata* cultured at fifferent temperatures'

△—△TBA6；▲—▲TBA12；

○—○TBA19；●—●TBA28。

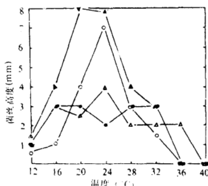


图2 病菌气生菌丝生长量-生长温度曲线

Fig. 2 Aerobic bypha growth of *A. alternata* strains cultured at different temperatures

△—△TBA6；▲—▲TBA12；

○—○TBA19；●—●TBA24。

2. 生长的pH条件

图3、图4指出，病菌在pH4.0以下的过酸条件下均不能生长，而4.5以上的pH条件对病菌的气生菌丝生长和菌落扩展能力有不同的影响。在pH5.0—10.5范围内，4个代表性菌株气生菌丝的高度基本不受pH变化的影响(图4)，pH对病菌生长的影响主要表现在菌落面积的扩展方面。菌落面积—pH梯度坐标图在4个菌株中基本呈S曲线型式(图3)，其中pH5.5—7.5为生长的最适pH范围，pH4.0—5.0及8.5—10.5为可以生长的pH范围；这种pH梯度性反应以生长力最强的菌株TBA6最为明显。

3. 光照条件对生长的影响

从表1看出，光照条件对病菌不同菌株生长能力的影响在菌落面积和气生菌丝高度两个参数上的趋势基本一致，有3种情况：①暗处理明显抑制生长的有9个菌株，全暗处理较12小时光暗交替处理的抑制作用为强；②光暗交替处理可以增强生长量的有TBA17、TBA19、TBA27和TBA33等4个菌株；③暗处理对生长量有明显增强作用的仅TBA27一个菌株。

4. 菌丝体损伤对生长的影响

表2的结果说明，损伤菌丝体不影响病菌的生长。

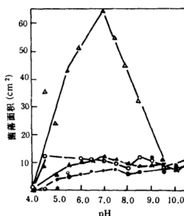


图3 病菌不同菌株在不同pH条件下生长的菌落面积

Fig.3 Colony area of *A. alternata* strains cultured under different pH conditions

△—△TBA6；▲—▲TBA12；

○—○TBA19；●—●TBA28.

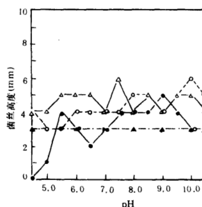


图4 病菌不同菌株在不同pH条件下生长的气生菌丝高度

Fig.4 Aerobic hypha height of *A. alternata* strains cultured under different pH conditions

△—△TBA6；▲—▲TBA12；

○—○TBA19；●—●TBA28.

表1 病菌不同菌株在3种光照条件下的生长能力

Table 1 The growth capability of *A. alternata* strains under 3 illumination regimes

菌株	菌落面积(cm²)			气生菌丝高度(mm)		
	全光	光暗交替	全暗	全光	光暗交替	全暗
TBA19	15	25	15	7	8	7
TBA28	20	25	18	7	7	7
TBA10	38	30	27	3	3	3
TBA34	39	41	32	5	5	3
TBA27	34	41	44	3	3	3
TBA14	46	41	41	8	8	2
TBA25	42	46	46	5	3	3
TBA32	47	45	42	7	5	5
TBA33	46	47	41	6	6	4
TBA17	44	53	40	2	3	2
TBA20	58	40	36	3	3	2

表2 菌丝体损伤对病菌生长能力的影响

Table 2 The effect of injuring mycelia on the growth capability of *A. alternata*

菌株	菌落面积(cm²)		气生菌丝高度(mm)	
	损伤	不损伤	损伤	不损伤
TBA6	64	64	5	5
TBA12	15	15	6	6
TBA19	13	13	7	7
TBA28	15	15	6	6

三、讨　　论

国外及我国台湾省[8~10]对烟草赤星病菌生物学等方面的研究结果，存在以下5方面的不一致：①病菌在培养条件下的生长产孢温度[6,7,11]；②生长产孢的pH条件及pH条件的影响在菌株间的差异[6,12]；③生长产孢对光照的依赖程度[6,13]；④以上这些性状与田间发病间的关系[6,8,9]；⑤菌丝生长与产孢的阶段性及机械损伤等刺激的影响。在这些方面产生分歧的原因有二：①试验中仅用1个或少数几个菌株获得的结果，既不能反映赤星病菌作为一个寄主范围广、致病性差异大的混杂种[2,6]的一般情况，又不能反映菌株间的差异性[14]。因此，仅由一个菌株获得的结果，不能作为病菌生物学特性的定论；②过去的研究着重于对病菌生物学的定性观察，忽视了对这些性状的定量测定，因而难以反映菌株间差异的数量效应[15]。Lucas 认为，研究赤星病菌的生物学必须同时注意菌株间的差别与环境条件的影响[6]。Harvey 和 Suprr(1985)指出，生物学测定应按一套标准化定量测定程度进行[15]。

鉴于上述，本文在对病菌13个菌株进行定量研究的基础上，首次提出我国烟草赤星病菌的基本生物学特性。关于病菌生长温度和pH条件的结果，与以前的大多数研究[6]一致；但生长起始温度较高，这与我国赤星病在烟草生长中后期发生较重[1]这一现象相符合。还指出光照条件对病菌生长无决定性作用，这与该病在我国不同纬度地区均可严重发生[1]的现象相符合，同时修正了以前有关研究不一致的提法[6]。此外，菌丝体损伤通常被作为研究营养生长向产孢变化的手段，有减弱营养生长和增强产孢的作用[16]，本文表明菌丝体损伤对营养生长无影响。

由于我国对烟草赤星病及其防治措施尚缺乏系统研究，因此，本文的结果无疑为该病的深入研究提供了基础。

参 考 文 献

[1] 陈瑞泰、王智发等，烟草病虫害防治，济南：山东科学技术出版社，1989，10—17。
[2] Fukuda N., Bull. Ustsunomiya Tob. Exp. Sta., 1968, **6**: 71—94。
[3] Norse, D., Annu. Appl. Biol., 1973, **74**: 297—306.
[4] Spurr, H. W., Phytopathol., 1977, **67**: 128—132.
[5] Stavely, J. R., Phytopathol., 1975, **65**: 897—901,
[6] Lucas, G. B., Diseases of Tobacco, 3rd ed. Biol. Cons. Assoc. Raleigh NC, 1975, 267—296.
[7] 董汉松、王智发，山东农业大学学报，1989，**20**(4)：1—8。
[8] Su, S. J. et al., Taiwan Tob. Wine Monop. Bur. Tob. Res. Bull. (TWTRB), 1981, **15**: 99—114.
[9] Su, S. J. et al., TWTRB, 1982, **16**: 81—86.
[10] Wu, D. K. et al., TWTRB, 1982, **16**: 87—93.
[11] 董汉松、王智发，中国烟草，1989，(4)：1—9。
[12] Wilson, J. H., Thesis, NC State Univ. Raleigh, NC, 1959.
[13] Ionnaidis, M. M. et al., Plant Dis. Rept., 1973, **57**: 39—42.
[14] Spurr, H. W., Plant Dis. Rept., 1971, **56**: 338—339.
[15] Spurr, H. W., J. Agric. Entomol., 1987, **2**: 117—122.

[16] Lukens, R. J. et al., Phytopathol, 1973, **63**: 176-182.

EFFECTS OF CULTURE CONDITIONS ON GROWTH CAPABILITY OF *ALTERNARIA ALTERNATA* (FR.) KEISSLER

Wang Zhifa and Dong Hansong

The biological properties of tobacco brown spot pathogen, *Alternaria alternata* were studied. Thirteen strains from different regions in China were tested in 4 examinations. AS-model curve of growth-temperatures was established based on the colony area of the pathogen strains cultured on PDA medium plate under the conditions of 8 temperature gradients. The minimum, optimum and maximum temperatures for the pathogen growth were 12—16, 20—24 and 36℃, resp. The results of growing 11 strains under 17 gradients of pH proved a linear relation of the pathogen growth capability to pH conditions. The linear relation was quantitatively fluctuated as changing pH, showing optimal colony enlargment at pH5. 5—7. 5 with a range of 4. 0—10. 5 suitable for growth. The weakened growth of the pathogen by darkness was evidenced by investigating the growth capability of 4 strains under the conditions of 3 illumination regimes. No obvious effects were found of injuring mycelia on the pathogen growth.

培养条件对烟草赤星病菌产孢能力的影响

董汉松　卜晓东
杨合同　孙立松　杨举田

鉴于烟草赤星病目前在我国各烟区发生的普遍性和严重性[1]，我们首先从病理学和病原生物学入手对该病进行了系统研究报道[2-7]，以便了解病害在我国发生的特点，弥补国内在这方面研究的不足，同时为探讨病害防治途径提供依据。本文继续报道关于温度、pH、光照等条件对病菌产孢能力影响的研究结果（1989－1990 年进行研究）。

一、材料与方法

1. 菌株

先后测定的赤星病菌（*Alternaria alternata*）13 个菌株是：TBA6、TBA10、TBA12、TBA14、TBA19、TBA20、TBA24、TBA25、TBA27、TBA28、TBA32、TBA33、TBA34。以前的测定表明在地理来源和致病力分化上具有代表性[4]，并按以前使用的方法[5]保存和繁殖。

2. 培养条件试验

三种基本培养条件是：温度设 12°、16°、20°、24°、28°、32°、36°、40℃共 8 个梯度；pH 从 2.5 到 10.5 以 0.5 单位为一梯度间隔，共设 17 个梯度，配制方法同前[8]，培养温度为 24℃±；采用 3 种光照处理，即一日 24 小时光照、12 小时光照间以 12 小时黑暗、24 小时暗处理，光暗处理方法同前[8]，培养温度也是 24℃±。以上 3 种处理均以 PDA 为培养基，每菌株每种处理各 3 次重复，培养 7 天后测定产孢指数[5]。

3. 菌丝体损伤试验

按半皿损伤法[8]对菌丝体损伤后继续培养（PDA 培养基、24℃±）7 天，测定产孢指数[5]，设 3 重复，取平均值。

二、结　　果

1. 产孢的温度条件

表 1 是对 13 个菌株在 8 个温度梯度下产孢情况进行测定的结果，虽然不同菌株在不同温度下的产孢量有高有低，但各个菌株产孢的温度三基点（最低、最适、最高温度）基本相同。为了比较清楚地反映这一趋势，选取代表致病力强、中、弱的 4 个菌株绘制培养温度-产孢指数曲线于图 1，曲线近似 S 型，产孢的最低、最适、最高温度范围分别为 12°－16°、

24°—28°、32°—36°，多数菌株产孢最低温度为16°—20°、最高为32℃（表1）。

表1 病菌13个菌株在8个温度梯度下的产孢指数

Table 1 The sporulation index under different temperatures

菌株	致病力*	在不同温度（℃）下的产孢指数							
		12	16	20	24	28	32	36	40
TBA6	弱	0.75	1.50	2.00	2.25	3.50	3.50	0.25	0
TBA10	弱	0	2.50	2.50	2.50	3.50	3.50	0	0
TBA12	中	0	0	0.25	0.50	1.00	1.25	0	0
TBA14	弱	0	0	0.50	0.50	1.00	1.50	0	0
TBA19	强	0	0	0.25	1.00	1.00	0	0	0
TBA20	中	0	0	0.50	0.50	1.00	1.50	0	0
TBA24	弱	0	0	0.25	1.00	1.00	0.25	0	0
TBA25	弱	0	0	0.25	1.00	1.00	0.25	0	0
TBA27	中	0	0	0.25	1.00	1.00	0.25	0	0
TBA28	强	0	0.50	1.00	1.50	2.00	2.00	0	0
TBA32	弱	0	0.50	0.50	1.00	1.50	1.50	0	0
TBA33	弱	0	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50	0	0
TBA34	中	0	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50	0	0

* 参见文献[4,9]。

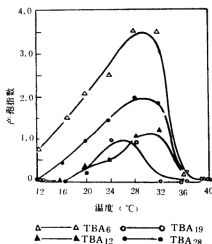


图1 培养温度-产孢指数曲线

Fig. 1 Sporulation-temperature relationship

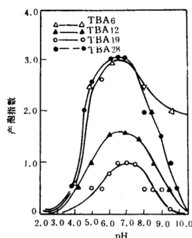


图2 pH条件-产孢指数曲线

Fig. 2 The sporulation-pH relationship

2. 产孢的pH条件

pH条件对病菌不同菌株产孢能力的影响呈相似趋势，用4个有代表性菌株所绘制的图线（图2）表明，产孢指数随pH梯度的变化而呈近S形曲线变化。产孢所需的最低pH

为 3.5--4.0，最适为 6.5—7.5，最高为 9.5—10.0。但有的菌株（如 TBA6）产孢的 pH 范围较广，在 pH 为 10.5 时仍能大量产孢。

3. 光照条件对产孢能力的影响

病菌产孢能力受光照条件的影响非常明显（图 3）。暗处理可显著增强产孢能力，其中以全暗处理作用最强，可使产孢指数提高 0.5－3.0 个单位，12 小时光暗交替可使产孢指数提高 0.5－2.0 个单位。

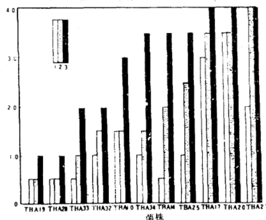


图 3 病菌不同菌株在 3 种光照条件下的产孢情况

Fig. 3 Effects of illustration on the sporulation

1.1 日 24 小时光照；2. 12 小时光照间以 12 小时暗处理；3. 1 日 24 小时暗处理。

4. 菌丝体损伤对产孢能力的影响

从表 2 可以看出，损伤菌丝体不影响病菌的产孢能力。

表 2 病菌在菌丝体损伤和不损伤时的产孢指数

Table 2 Effects of injuring on the sporulation

菌株	TBA6	TBA12	TBA19	TBA28
损伤	4.0	1.0	1.5	2.5
不损伤	3.5	1.0	1.5	2.5

三、讨　论

王智发、董汉松[8]最近指出，前人对烟草赤星病菌生物学的研究存在 5 个方面的不一致，主要原因是试验测定的菌株少，缺乏代表性，同时忽视了定量研究。据此用 13 个菌株作测定，表明病菌生长的最低、最适、最高温度分别为 12－16℃、20－24℃、36℃；生长的 pH 范围为 4.0—10.5，最适为 5.5—7.5。本研究用同一组菌株测定了病菌产孢的主要培养条件，表明病菌产孢与生长的温度和 pH 范围基本相同，并与前人多菌株测定的结果[10]相近，还可以发现，病菌的产孢较生长的适温范围高 4℃，pH 范围高一个单位，光照对病菌生长无明显影响[8]，但暗处理可以明显增强产孢能力。光照条件对生产和产孢的这种影响在所有菌株中都是一致的，这与前人关于光照条件的影响因菌株而异的结果[11,12]有所不同，说明同种病菌不同菌株在生物学上具有较多的共同性。

由于烟草赤星病 60 年代末到 80 年代之前在我国一直不是一个主要病害[2]，因此有关基础研究做得很少；而它近几年来发生的严重性和普遍性，提出了进行该项研究的必要性。本文的一个直接意义是为病害及防治途径的进一步研究打基础。因为在这些研究中经常需获得孢子或菌丝体作为单独的接种体使用[2,7,9]，前人曾通过改变培养条件或菌丝体损伤促进产孢[11,12]，本文表明适当提高温度和 pH 可获得较多的孢子，而菌丝体损伤无此作用。

参 考 文 献

[1] 陈瑞泰、王智发、王念慈，烟草病虫害防治，济南：山东科学技术出版社，1988，10－17。

[2] 王智发、董汉松，烟草赤星病菌致病性-生长产孢关系及不同接种体组分的作用，中国烟草学会第二次会员代表大会会刊，中国烟草学会，1992。

[3] 董汉松、曲建军、王智发，烟草对赤星菌毒素的快速反应及在品种抗性鉴定中的作用，中国烟草学会第二次会员代表大会会刊，中国烟草学会，1992。

[4] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力测定方法的研究，山东农业大学学报，1989，**20**：1－8。

[5] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌不同菌株在11种培养基上的生长产孢能力，中国烟草，1989，(4)：1－9。

[6] 董汉松、王继伟、王智发，烟叶煎汁培养基中烟叶用量对烟草赤星病菌生长和产孢能力的影响，莱阳农学院学报，1991，**8**(1)：42－46。

[7] 董汉松，植物诱导抗性的机制和应用前景，植物抗性生理研究(赵可夫主编)，济南：山东科学技术出版社，1992，193－201。

[8] 王智发、董汉松，培养条件对烟草赤星病菌生长能力的影响，山东农业大学学报，1991，**22**：207－211。

[9] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力分化与弱毒株抗性诱导作用的研究，植物保护学报，1992，**19**：87－90。

[10] Lucas, G. B., Diseases of Tobacco(3rd ed.), NC, Raleigh: BCA, 1975, 267－296.

[11] Spurr, H. W., An efficient method for producing and studying tobacco brown spot disease in the laboratory, Tob. Sci., 1973, **17**: 145－148.

[12] Stevenson, R. E. and S. P. Pennypacker, Effect of radiation, temperature, and moisture on conidial germination of *Alternaria alternata*, Phytopathol., 1988, **78**: 931－934.

EFFECTS OF CULTURAL CONDITIONS ON SPORULATION OF TOBACCO BROWN SPOT PATHOGEN

Dong Hansong, Bu Xiaodong, Yang Hetong,
Sun Lisong and Yang Jutian

Thirteen strains of *Alternaria alternata*, the pathogen of tobacco brown spot, were studied to testify their sporulating capability affected by temperature, pH condition and illumination. AS-model curve of sporulation-temperature was established based on the sporulating indices of the pathogen strains cultured on PDA medium under 8 temperature gradients. The minimum, optimum and maximum temperatures for sporulation were 12－16℃, 24－28℃ and 32－36℃ respectively. When the pathogen strains were grown under 17 pH gradients, their sporulating capability varied as pH varied, showing a S-model curve of sporulation-pH gradient, with mini., opti. and maxi. temps for sporulation of pH 3.5－4.0, 6.5－7.5 and 9.5－10.0 resp. The sporulating capability could be enhanced by darkness treatment, while injuring mycelia gave no effect.

烟叶煎汁培养基中烟叶用量对烟草赤星病菌生长和产孢能力的影响

董汉松　王继伟　王智发

烟草赤星病在我国各烟区发生普遍，造成严重为害[1]。但国内对该病一直缺乏研究，而国外的研究结果很不一致[2]。这就要求对其病原学和病原生物学等进行系统测定，为防治提供依据。笔者在试验中发现，强致病力菌株产孢量低，影响了有关病理学的进一步研究[3,4]。改善培养条件是增强病菌生长和产孢能力的方法之一[2]，本文报道这方面的结果（1989 年进行研究）。

一、材料与方法

（1）供试菌株：测定的 7 个烟草赤星病菌菌株 TBA6、TBA12、TBA19、TBA20、TBA25、TBA27 和 TBA28 代表了致病力强、中、弱 3 个类型[3]，通常保存在 4℃下的 PDA 斜面上。

（2）培养基制备：①马铃薯蔗糖琼胶培养基（PDA）[5]，用作对照，在坐标中代号为 1。②干烟叶煎汁琼胶培养基（DTLA），用以前使用的方法配制[4]。5 种烟叶用量（g/L）为：DTLA30，30g；DTLA60，60g；DTLA90，90g；DTLA120，120g；DTLA150，150g，琼胶均 18g，在坐标中的代号依次为 2、3、4、5、6；③鲜烟叶煎汁琼胶培养基（FDTAL），选半成熟至成熟叶定量加以组织捣碎，双层纱布过滤后取滤液制成琼脂（18g/L）培养基。5 种烟叶用量（g/L）为：FDTLA30，30g；FDTLA50，50g；FDTLA100，100g；FDTLA150，150g；FDTLA200，200g。在坐标中的代号依次为 7、8、9、10、11。④烟叶煎汁蛋白胨培养基（PT-LA）：鲜烟叶 120g（捣碎榨汁）；多聚蛋白胨，10g；琼脂粉，18g；蒸馏水，1000ml。

（3）测定方法：将各供试菌株在各培养基上生长 7 天（24℃±），分别计测菌落面积（cm^2）、气生菌丝高度（mm）和产孢能力。产孢能力按以前的方法分级测定[4]。每菌株每种培养基各 3 次重复，取平均值。

二、试验结果

1. 烟叶用量对病菌生长能力的影响

从图 1 可知，供试 7 个菌株在 5 个烟叶用量的 DTLA 和 FDTLA 上的菌落扩展面积，均低于在 PDA 上的菌落面积。全部菌株在 PDA 上菌落面积均达 10－30cm^2，在 TLA 上只有 47％的统计值大于 10cm^2，其中 73％为 10－15cm^2。所用烟叶量的高低，明显影响病菌的生长能力。DTLA 中干烟叶用量为 30g（DTLA30）时菌落扩展最好，全部菌株菌落面积达 10－20cm^2。烟叶用量的提高明显降低病菌生长能力，随烟叶用量依次为 60、90、

120、150g，菌落面积在 10cm² 以下的测定值分别为 29%、57%、71%、100%。

在鲜烟叶培养基(FDTLA)上也发生类似情况。生长最适宜的烟叶用量为 30—50g(FDTLA30 和 FDTLA50)，86%的测定值为 15cm² 以上。烟叶用量从 100g 提高到 200g，菌落面积低于 10cm² 的测定值从 57%增加到 100%；当烟叶用量为 200g 时，有 43%的测定值低于 5cm²。

两类烟叶煎汁培养基对气生菌丝有相似影响，提高烟叶用量可微弱增强菌丝的生长。随烟叶用量的提高，菌丝高度大于 3mm 的测定值由 14%逐渐增加到 43%，但仍以在 PDA 上生长的为好(图 2)

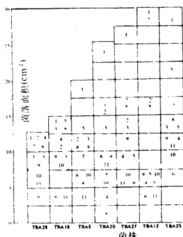


图 1　病原菌不同菌株在 11 种烟叶煎汁培养基上生长的菌落面积(含 PDA)

Fig. 1　Growth of the pathogen on TLA medium

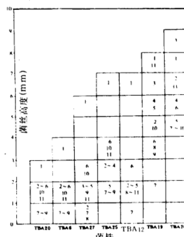


图 2　病菌不同菌株在 PDA(ck)和各种 TLA 培养基上生长的气生菌丝高度

Fig. 2　The hypha height on the TLA medium

1. PDA(CK)；2. DTLA30；3. DTLA60；4. DTLA90；5. DTLA120；6. DTLA150；7. FDTLA30；8. FDTLA50；9. FDTLA100；10. FDTLA150；11. FDTLA200.

2. 烟叶用量对病菌产孢能力的影响

除菌株 TBA19 和 TBA28 以外，其余菌株在 TLA 上均较在 PDA 上的产孢能力强。无论是在 DTLA 还是在 FDTLA 上，产孢能力均随烟叶用量的增加而呈“S”形曲线加强趋势。干烟叶用量在 30—60g、鲜烟叶在 50—100g，产孢曲线呈指数上升；产孢饱合点分别是，干烟叶 60—90g，鲜烟叶 100—150g(图 3)。可见，干烟叶培养基更适于产饱。

3. “蛋白胨效应”

从附表可以看出，烟叶煎汁培养基中加入蛋白胨明显影响病菌的生长和产孢能力。这种“蛋白胨效应”有 3 点：①明显减弱所有菌株的菌落扩展能力；②对气生菌丝生长与产孢能力的影响呈正相关关系；③对产孢能力较强的菌株，可加强其气生菌丝生长量和产孢量。而对产孢能力较弱的菌株，菌丝生长与产孢量不受影响。

附表　烟叶煎汁培养基中加入蛋白胨对病菌生长和产孢能力的影响

Table　The peptide effects

菌株	FDTLA120			DTLA			蛋白胨效应(%)		
	菌落面积 (cm²)	菌丝高度 (mm)	产孢等级	菌落面积 (cm²)	菌丝高度 (mm)	产孢等级	菌落面积 (cm²)	菌丝高度 (mm)	产孢等级
TBA6	9.84	2.0	2.5	9.21	3.0	3.0	−6.4	50.0	20.0
TBA12	28.4	2.0	2.0	10.8	3.0	3.5	−31.9	50.0	75.0
TBA19	31.0	3.0	0.5	16.3	3.0	0.5	−14.5	0	0
TBA25	12.8	2.0	1.85	13.5	2.5	3.0	6.1	25.0	100
TBA28	30.8	4.5	0.5	8.4	4.0	0.5	−72.9	−11.0	0

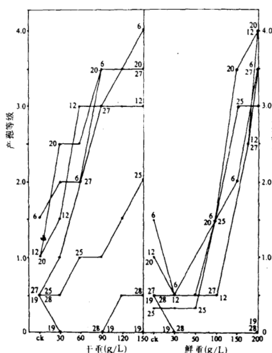


图3　病菌在烟叶用量不同的TLA上的产孢等级

Fig. 3　The sporulation on the TLA medium

6. TBA6; 12. TBA12; 19. TBA19; 20. TBA20; 25. TBA25; 27. TBA27; 28. TBA28.

三、讨　　论

在烟草赤星病菌生物学、病害病理学、诱导抗性及防治研究中[6,7]，常需获得大量孢子。而病菌致病力与产孢能力的反相关关系[6]，对这一要求造成了困难。国外较早的研究中提出的促进产孢的方法[2]，包括改进培养基成分，经试验表明不能使国内菌株达到理想

的产孢效果，尤其难以促使强致病力菌株大量产孢[1]。这显然影响了以上所述研究的进行。本文指出，干烟草煎汁培养基可以增强病菌的产孢能力。这对需要大量孢子所进行的研究，无疑提供了一个可行的方法。

另一方面，由于病菌致病力与生长、产孢能力的反相关关系[6,7]，要同时获得理想的生长量和产孢量是困难的。对病菌-寄主相互关系以及诱导抗性的研究常需要区别病菌不同组分（菌丝体、孢子、毒素等）的作用，而获得理想的生长量并不困难。因此，PDA、TLA 培养基以及本文所述"蛋白胨效应"可以满足不同研究目的的需要。

参 考 文 献

[1] 陈瑞泰、王智发等，烟草病虫害防治，济南：山东科学技术出版社，1990，10－17.

[2] Lucas，G. B.，Diseases of Tobacco(3rd ed.)，BCA，Raleigh，North Carolina，1975，267－296.

[3] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力测定方法的研究，山东农业大学学报，1989，**20**(4)：1－8.

[4] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌不同菌株在 11 种培养基上的生长和产孢能力，中国烟草，1989，**89**(4)：1－9.

[5] 方中达，植病研究法，北京：农业出版社，1979，83.

[6] Dong，H. S.，Wang，Z. F.，Pathogenicity differentiation of *Alternaria alternata* and induced resistance of tobacco to brown spot by weak virulence strains，CORESTA Information Bullitin，CORESTA Symposium. Kallithea，Greece，1990，85－91.

[7] Su，S. J.，Sun，S. K.，Studies on the tabacco brown spot disease in Taiwan I. Morphology and pathogenicity of *Alternaria alternata*，Taiwan Tob. Wine Monop. Bur. Tob. Inst. Bull.，1981，**15**：99－114.

EFFECTS OF LEAF AMOUNTS IN TOBACCO LEAF EXTRACT MEDIA ON GROWTH AND SPORULATION OF *ALTERNARIA ALTERNATA*

Dong Hansong，Wang Jiwei and Wang Zhifa

The growth and sporulation of 7 strains of *Alternaria alternata* were tested on the dry and fresh tobacco leaf extract medium (simply called as DTLA and FDTLA respectively) each with 5 amounts of usage. The growth of 7 strains on DTLA and FDTLA was less than that on PDA used as control. The amounts of leaves for the best growth of the pathogen were determined to be 30g/L in DTLA and 30－50g/L in FDTLA respectively Increasing amounts of tobacco leaves to excess the limit tended to reduce the growth of the pathogen. The promoting sporulation of the strains was obtained on both DTLA and FDTLA in comparision with PDA medium. Also the capability of the pathogen's sporulation was enhanced by increasing quantity of tobacco leaves in the 2 media，with a saturated quantity for sporulation of 60－90g/L in DTLA and 100－150g/L in FDLA respectively. The growing capability of the pathogen was decreased and the sproulation strengthened by adding peptide in FDTLA medium.

烟草赤星病菌致病力-生长产孢关系及不同接种体组分的作用

王智发　董汉松　曲建军

由于病菌(*A. alternata*)是一个具有致病性和生物学性状的地理差异的混杂种,因而国外的有关研究对了解国内病菌特性仅有参考作用。国内烟草赤星病防治一直不能取得理想的效果,对病菌的生物学与病理学特性缺乏了解是一个重要原因。因此,这项工作有急需进行的必要。本文主要报道这方面的研究结果(1989 年进行研究)。

一、材料与方法

1. 供试材料

先后测定的 20 个菌株是从国内 10 个烟区的烟株上分离的,按 Simmons(1967)的描述和致病力测定鉴定为 *Alternaria alternata*(Fr.)Keissl.[1]。

所用烟草品种为 G80,按以前使用的方法分别获得幼苗与离体叶片[2]。

2. 生长与产孢能力的测定

按以前的方法在 PDA 平板上培养供试菌株,分别测定菌落面积(cm^2)、气生菌丝高度(mm)和产孢等级。每菌株 10 个重复(40 皿),取平均值后按表 1 的标准将这 3 个参数同质化为生长(产孢)指数。

3. 接种体的制备

所用 6 种接种体分别按如下方法制备:①整体接种体(M)是将病菌在 PDA 平板上生长 21 天(±24℃)的菌落用 1%(w/v)灭菌葡萄糖溶液浸泡 15 分钟,刮下菌丝和孢子;孢子和菌丝体含量分别调到 1×10^5 孢子/ml 和 0.5g/ml;②孢子液(C)是各取 30—50ml M 液先用灭菌脱脂棉过滤去除菌丝体。将滤液离心(4000r/min,20 分钟)并用灭菌水洗 3 次,最后一次沉降的孢子用 1%葡萄糖溶液悬浮,孢子含量调到 1×10^5/ml;③平板培养物浸出液(PS)为制备 C 时的第一次离心的上清液,经镜检和平板培养确证不含孢子和菌丝体;④菌丝体悬浮液(H)。将菌株在查氏培养液中振荡培养(200—240 次/分,24℃)21 天得到无孢子培养液,按以上方法离心清洗三次并用 1%葡萄糖溶液悬浮和调节菌丝体含量为 0.5g/ml;⑤液体培养物离心上清液(SS),为制备 H 时第一次离心上清液,经镜检和平板培养证明不含菌丝体和孢子;⑥细胞破碎离心上清液(CB)。各取 H 液 30—50ml 作超声波破碎(23—25kHZ,间歇式,5 分钟),破碎液经 6000r/min 离心 30 分钟,取上清液检查不含孢子、菌丝体和细胞碎片,即得接种体 CB。

对照液为:对照 1,查氏培养液不接菌振荡培养 21 天;对照 2,灭菌的 1%葡萄糖溶

液。

4. 接种与致病性定量的方法

用悬滴法分别接种 9—10 叶期幼苗的第 4、5 真叶和相应叶位的离体叶。幼苗接种的每菌株每接种体 20 次重复；离体叶接种 10 个重复。诱发病害后进行检测，结果取平均值。

致病性分别以侵染能力和致病能力来表示。侵染能力测定三个参数：①对离体叶的生长穿透能力（DPC）；②幼苗的病叶率（RDL，%）；③位点发病率（RDS，%）。致病能力分别测定幼苗的病情指数（DPSL）和离体叶的病情指数（DPDL）。

表 1　病菌生长（产孢）指数的划分标准

Table 1　Standards of classifying class of growth and sporulation of *Alternaria alternata*

指　数	菌丝面积范围（cm^2）	菌丝高度范围（mm）	产孢等级范围
0		0	0
1	≤7	≤1	≤0.45
2	7.1—14.0	1.1—2.0	0.46—0.90
3	14.1—21.0	2.1—3.0	0.91—1.35
4	21.1—28.0	3.1—4.0	1.36—1.80
5	28.1—35.0	4.1—5.0	1.81—2.25
6	35.1—42.0	5.1—6.0	2.26—2.70
7	42.1—49.0	6.1—7.0	2.71—3.15
8	49.1—56.0	7.1—8.0	3.16—3.60
9	56.1—63.0	8.1—9.0	3.61—4.05
10	63.1—70.0	9.1—10.0	4.06—4.50

二、结果与分析

1. 致病力与生长、产孢能力的关系

对 20 个菌株测定的结果（图 1）表明，病菌的致病力在不同菌株间差异明显，有 2 个菌株（TBA19 和 TBA28）致病力最强，4 个菌株（TBA8、TBA12、TBA17 和 TBA24）中等，其余菌株较弱。这种差别在 5 项测定中趋势一致。

以 10 个菌株测定致病性与生长、产孢能力的关系，结果指出，病菌的侵染能力在 3 个参数上（图 2）、致病能力在 2 个参数上（图 3），均与气生菌丝生长能力呈正相关、与菌落生长和产孢能力呈负相关关系。

2. 不同结构与化学组份的致病性

根据以上用整体接种体（M）测定的结果，选出致病性不同的 6 个菌株，测定其 2 种结构组分和 3 种化学组分的致病性。总的来看，这些组分的致病性强弱与其来源菌株的整体致病性（用 M 接种）强弱是一致的；同时，不同菌株整体致病性强弱与其不同接种体组分

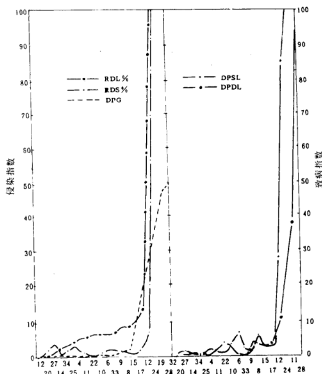


图 1　按致病性顺序排列的病菌 20 个菌株的侵染指数与致病指数曲线

Fig. 1　Pathogenicity to tobacco of *A. alternata* strains

注：①CK_2——处理的各项致病性参数均为 0(表 2—5 同)。

②RDL——幼苗发病叶率；

RDS——离体叶发病率；

DPG——对离体叶的生长穿透指数；

DPSL——幼苗发病的病情指数；

DPDL——离体叶发病的病情指数。

的致病作用有关，表现为菌株致病性强弱取决于某种组分的作用。图 4 采用分组分析指出了这一规律。

孢子接种体(C)的致病性与整体致病性基本等值，尤以强致病性菌株 TBA19 和 TBA24 为明显(图 4,C)，表明它是决定整体致病性的主导因子。菌丝体(H)的致病性在强致病性菌株中明显较 C 和 M 的为弱(图 4,C)；在中、弱致病性菌株中虽表现一定的致病性，但这些菌株的 M 致病性较 H(单独接种)的显著为低(图 4,A、B)。这表明在整体接种条件下，H 对菌株的整体致病性无明显作用。

三种化学组分对烟叶的损害(以与上相同的参数加以定量)亦以菌株整体致病性的强弱而不同。PS 是平板培养物产生的可扩散物质，SS 是液体培养物产生的可溶性物质。它们对烟叶的损伤，总的看以强致病性菌株的较弱致病性菌株的为强(图 4)；但单独接种

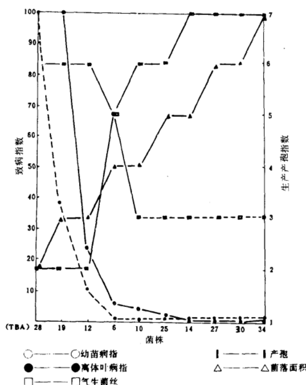


图 2 病菌 10 个菌株侵染能力与生长产孢能力的关系

Fig. 2 Relationships between infection ability and growth/sporulation of *A. alternata*

时，它们的作用较 M、H 和 C 的明显为弱(图 4,C)，说明这两种形式的物质对烟叶的损伤对强致病性菌株的整体致病性不起主要作用。CB 是一种细胞内的"可致病物质"，它对烟叶的损害只发生于弱致病性菌株中(图 4,A)。

三、讨　　论

对致病性以侵染能力和致病能力两项指标分别进行研究分析，由于可以反映病菌致病作用的阶段性及不同机制，因而有助于全面了解致病性与生长产孢间的关系。本文据此进行研究，表明烟草赤星病菌的致病力与菌落生长及产孢能力呈负相关、与气生菌丝生长呈正相关，这一趋势在致病性的两项指标的 5 个参数测定中得到了充分证明。

这种致病性-生长产孢关系的发生有三个层次的机制。首先，按共同进化理论，病菌致病性的建立是病原-寄主宏观进化的结果，而宏观进化产生于微观进化的积累与质变。致病性的建立是宏观进化的主导方向，而微观进化在各个性状上并不是同步发生的，这决定了病菌并不是在各个性状上都与这一主导方向相同步。Lloyd(1972)提出了这方面的遗传证据，他证明烟草赤星病菌的致病性和生长产孢性状的控制基因分别存在于染色体上和核外，这决定了微观进化难以在致病性和生物学性状上同时发生。另一方面，协调培养条

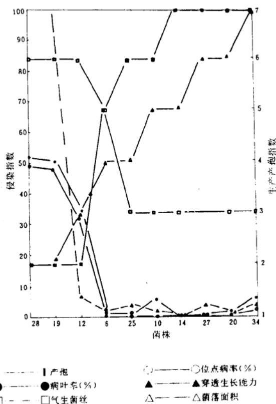


图 3　病菌 10 个菌株致病能力与生长产孢能力的关系

Fig. 3　Relationships between virulence and growth/sporulation of *A. alternata*

件可使某些菌株产孢能力和致病力都得到加强，说明微观进化可以对宏观进化的主导方向有条件地加以改变。这就为改善研究方法提供了依据。

致病性的建立是这一宏观进化的主导方向，同时决定了病菌致病性的发生受"单一种群内在协调稳衡机制(MSM)"的作用。在病菌有多种组分参于影响时，MSM 趋向于使病菌以最有效的方式与寄主发生作用。这是致病性-生长产孢关系的第二层次的机制。本文提出的病菌 5 种"可致病组分"对整体致病性的不同影响，正是这一机制的表现。其中，孢子的强致病性的建立，被证明是病菌致病的最有效方式。

第三个层次的机制是病菌的变异。在宏观进化的特定阶段，变异表现为病菌不同菌株致病性和生物学性状的差异；在微观进化及其积累的过程中，变异表现为病菌可以通过不同途径建立致病性。本文表明的病菌 PS、SS 和 CB 对不同菌株整体致病性的影响，便说明了这一点。

本文的结果对基础和应用研究有三方面的意义。首先，明确致病性-生长产孢关系，有助于进一步研究病菌的生物学与病理学，如孢子形态与致病性的关系。第二，在明确不同组分的致病性的基础上，抗病育种可引入主导性致病因子，以简化基因对基因关系，从而有利于加强抗病基因的表达和性状选择的目标性。第三，将主导性致病组分引入抗性诱导，可以加强和鉴别不同组分作为抗性诱导物对寄主的快速反应和反应能力的影响，从而

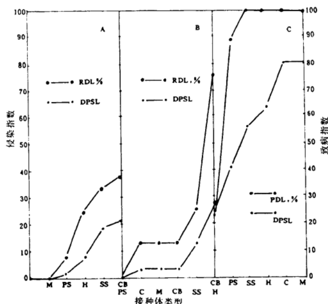


图4 强、中、弱3类菌株各接种体组分的致病性趋势

Fig. 4 Pathogenicity ability of different components of *A. alternata*

A. 弱致病性菌株组，曲线的值为TBA6、TBA25和TBA34各相应参数值和均值；

B. 中致病菌株TBA8；

C. 强致病性菌株组各值为TBA10和TBA28调度值的反均。

诱导高抗基因的表达(然后加以利用)。

参 考 文 献

[1] Lucas, B. G., Diseases of tobacco(3rd ed.), BCA, Raleigh, North Carolina, 1975, 267－296.

[2] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力测定方法的研究，山东农业大学学报，1989，**20**(4)：1－9。

PATHOGENICITY-BIOLOGY RELATIONSHIPS INFLUENCED BY INOCULUM COMPONENTS IN *ALTERNARIA ALTERNATA*

Wang Zhifa, Dong Hansong and Qu Jianjun

The preliminary tests were carried out for pathogenicity of 20 strains of *Alternaria alternata*, collected from 10 places in China. The strains showing strong, middle and weak pathogenicity respectively were selected to investigate the relationship between

pathogenicity and capability of sporulation and growth under cultured conditions. The sporulation indices and growth indices with 3 parameters were obtained for each strains on PDA cultures. The pathogenicity was evaluated in capability of invasion (CI) and ability of inducing brown spot (AID). CI was given in 3 parameters which are indices of penetrating to and growing on the detached leaves inoculated, ratio of diseased leaves of seedlings and ratio of diseased sites on which the inoculum droppings were inoculated. AID was measured in 2 parameters, disease indices of both detached and undetached leaves inoculated. The results indicated that at all of parameters of pathogenicity the positive relativity was found between pathogenicity and aerobic hypha growth and inverse between pathogenicity and capability of both sporulation and colony enlargement. The further results were given by diseased seedlings inoculated respectively with 6 kinds of inocula prepared from each of 6 stains, and showed that the aforementioned relationships between pathogenicity and biology of the pathogen were affected by the pathogenicity of structural and biochemical components of the inocula.

赤星菌毒素对烟草幼苗致病特性的研究

董汉松　曲建军　王智发
王少杰　刘广玉　杨合同

在以病害防治为目的的研究中，病原物产生的致病毒素主要被用作寄主抗性突变[1]的抗性诱导[2]的胁迫因子而加到寄主的组织（细胞）培养物中[3]。在此过程，要获得理想的抗性突变或诱导抗性，须有两个条件，一是毒素处理能够引发寄主的快速和强烈反应；二是这种反应能代表寄主的抗病性[4]。近年来国外对赤星菌（*Alternaria alternata*）毒素及其作用的机制已有系统深入的研究[5]，但用于病害防治方面的研究却相对较少。国内在这些方面的研究也是空白。本文报道的主要内容是烟草对赤星菌毒素的反应及与品种抗病性的关系（1990 年进行研究），目的是为与病害防治有关的研究打基础。

一、材料与方法

1. 供试材料

所用菌株为 TBA19 和 TBA28，均是强致病力菌株[6]，共测定 21 个烟草品种，见表 1，按以前用的方法育苗[7]。

表 1　烟苗在 3 种产毒素培养液和毒素液中的表现[a)]

Table 1　Selection of methods of the toxin-producing media

处理		稀释度						
		原液	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$
毒素处理[b)]	查彼毒素液	100	100	100	100	100	50	0
	Hogland	0						
	改良 Hogland	100	100	50	0			
对照[c)]	查彼培养液	100	50	0				
	Hogland	0						
	改良 Hogland	0						

a）表中数字为发生萎蔫的烟苗比率（%）；b）培养病菌后的无细胞溶液；c）不加病菌的培养液。

2. 产毒素培养液的筛选

共测检了 3 种培养液：查彼培养液[8]、Hogland 培养液[9]和改良 Hogland 培养液（在 Hogland 培养液中加 1.5%w/v 蔗糖）。使菌株 TBA19 分别在 3 种培养液中震荡生长（24℃±）28 天，纱布过滤除去菌丝体，再经 3 次离心（4000r/min，30 分钟）、镜检无细胞，

得毒素原液，原液按倍比稀释到 1/64，各 8ml 装入洗净并灭菌的青霉素小瓶中，将品种 G140 的 2 叶期幼苗洗净根后播入瓶内，每瓶 10－15 株苗，每种培养液的每个稀释度 2 瓶，各以相应培养液及稀释液同样处理为对照。在 25℃培养 3 天，以 50％的烟苗发生萎蔫的最低浓度为毒素活性临界值(TWE50)。

3. 毒素粗提取

将菌株 TBA28 在查彼培养液中震荡生长 28 天，根据 Bottini 等(1981)[10]的方法获得毒素粗提液。

4. 烟苗对毒素反应的测定

毒素液经 2 倍稀释后，按 1.2 所述类似方法处理 21 个品种的幼苗，每品种 2 瓶，每瓶 10 株苗，在 25℃下培养过程中观察病变；到第 4 天检查记载发病等级。发病等级标准是：0 级，无病变；1 级，下 2 叶轻度萎蔫；2 级，下 2 叶萎蔫枯死；3 级，全部长出叶萎蔫，下 2 片枯死，叶芽正常；4 级，全株枯死。

5. 幼苗接种

用菌株 TBA28 的孢子悬浮液(10^6 孢子/ml)按悬滴法接种 21 个品种 6－7 叶期幼苗的第 5、6 真叶[7]，每品种接种 5 株苗，用 1％葡萄糖溶液同样接种为对照，诱发病害期间观察病变，第 5 天计测病叶率与发病等级[7]。

二、试验结果

1. 病菌在 3 种培养液中的产毒素能力

由表 1 可知，病菌在查彼培养液中产毒素能力最强，TWE50 为 32；在 Hogland 中不产毒素，加入 1.5％的蔗糖后产毒素量也很低。查彼液本身可对幼苗造成轻微损害，但可通过设置对照和对毒素引起的幼苗反应进行分级分析来消除由此造成的误差。因此，以下试验选查彼培养液用于病菌产毒素培养。

2. 烟苗对毒素的快速反应

幼苗接受毒素处理后 12 小时即可见明显病变，根部变褐或淡褐色；继之多在 36 小时、最早的在 20 小时发生叶部萎蔫；48 小时根部变褐加重，须根全部褐变，主根褐变程度依品种而异，并伴随有须根脱落，依品种不同须根脱落的量占须根总量的 20－90％不等(表 2)，同时叶片萎蔫加重，有的品种开始枯死。所有品种的对照(用不加病菌的培养液处理幼苗)并不发生上述病变。此外，品种对毒素的反应在根部褐变和须根脱落上与在叶片萎蔫上的表现趋势基本一致，品种云烟 2 号等反应最早、也最强烈，中烟 86 等 3 个品种反应最晚、也最弱，见表 2。

相比之下，烟苗对悬滴接种的反应发生得明显迟后(表 2)。最早的反应是病菌菌丝穿透叶片而在接种点背面生长，多见于 30 小时以后，而且在 48 小时内在品种间无明显差别。从 30－72 小时开始在接种点附近形成中心病斑，在相对湿度 100％(保持水滴)时中

心病斑呈透明水浸状，此时它的面积和程度在品种间无明显不同；72 小时不再保湿后逐渐扩散成枯死斑，此时在品种间才具明显的差异。

表 2　烟草对赤星菌毒素和对悬滴接种反应的比较

Table 2　Comparision of tobacco responses to AT-toxin and spore inoculation

供试的品种	对毒素的反应				对悬滴接种的反应	
	根部变褐		叶片萎蔫	须根脱落		
	开始的时间(小时)	48 小时的程度[a]	开始的时间(小时)	比例(%)	菌丝穿透生长[b]开始时间(小时)	中心病斑形成的时间(小时)
云烟 2 号	12	4.0	20	90	30	42
NC326	12	4.0	20	90	24	48
G140	12	4.0	20	90	24	48
白肋 21	12	4.0	36	90	30	40
长脖黄	12	4.0	24	90	35	40
G28	12	4.0	40	90	35	40
Coker319	14	2.0	40	80	40	35
G70	14	2.5	24	80	35	35
NC95	14	3.5	24	85	24	30
大黄金	15	3.5	36	80	30	35
中烟 14	16	3.5	36	85	24	30
NC89	17	4.0	36	85	30	35
NC82	17	4.0	36	85	35	40
红　大	18	1.5	40	70	42	48
K326	17	3.5	36	85	24	30
G80	18	2.0	36	70	30	35
K394	18	1.5	36	65	42	48
中烟 15	19	2.0	36	50	35	40
永定 401	21	1.0	36	20	48	72
中烟 86	21	1.0	40	20	48	72
永定 1 号	23	1.0	40	20	48	72

a）目测标准为：1、2、3、4 级分别指主根严重变褐部分占根长的 1/4、1/2、3/4 和全部；b）确定方法见文献[7]。

3. 品种反应在量上的差别

用品种接受侵根处理的反应，和用悬滴接种后烟叶率和病情指数，均能明显地表明品种的抗病性差异(表 3)。这里着重注意的是，所有品种对毒素的反应都比对悬滴接种的反应要强烈得多(表 3)，由毒素引起的发病程度较由悬滴接种引起的发病程度平均高近 70%。

表 3 烟草不同品种用悬滴法和毒素液浸根法接种后的发病情况

Table 3 Tobacco pathogenesis degree caused by AT-toxin and spore inoculation

品 种	幼苗悬滴法		毒素液浸根法
	病叶率(%)	病 指	病 指
NC95	36	36.7	90.0
长脖黄	35.2	35.0	95.0
永定 401	46.8	33.3	77.5
NC326	31.5	31.7	97.7
永定 1 号	29.3	30.0	40.0
G140	55.8	28.3	97.5
K326	37	26.7	86.1
中烟 14	41.7	25.0	87.5
大黄金	37	25.0	90.0
云烟 2 号	26.4	23.3	100
白肋 21	46.8	23.3	97.5
G80	20	23.3	85.0
中烟 15	30.2	22.0	80.0
NC89	17.2	21.7	87.5
NC82	17.2	20.0	87.5
G70	21.7	20.0	92.5
红花大金元	36.4	20.0	87.5
K394	21.2	18.3	85.0
G28	15.4	18.3	95.0
中烟 86	28.3	16.7	66.7
Coker319	16.7	13.3	95.0

表 4　幼苗悬滴法与毒素浸根法测定间的吻合度

Table 4　The correlation of tobacco responses to AT-toxin and spore inoculation

品　　种	病情指数从高到低的排列次序			吻合度(%)
	悬滴法	毒素液浸根法	差　　值	
NC95	1	6	5	75
长脖黄	2	4	2	900
永定 401	3	11	8	60
NC326	4	2	2	90
永定 1 号	5	13	8	60
G140	6	3	3	85
K326	7	8	1	95
大黄金	8	6	2	90
中烟 14	8	7	1	95
云烟 2 号	9	1	3	60
白肋 21	9	3	6	70
G80	9	9	0	100
中烟 15	10	10	0	100
NC89	11	7	4	80
NC82	12	7	5	75
G70	12	5	7	65
红花大金元	12	7	5	75
G28	13	4	9	55
K394	13	9	4	80
中烟 86	14	12	2	90
Coker319	15	4	11	45
平均值	—	—	—	77.9

注：吻合度 = $\frac{20-\text{差值}}{20}\times 100$。

4. 品种对毒素和悬滴接种反应趋势的一致性

按表 4 的方法所得到的两种反应间的吻合度，在 11 个品种中高于 80%，在 14 个品种中高于 78%，21 个品种平均为 80%，说明用这两种方法测定的抗病性趋势一致。

三、结论与讨论

1. 关于产毒素培养液

查彼培养液是真菌液体培养最常用的培养基[8]，而 Hogland 培养液多用于植物的水培[9]。Hogland 液不能使病菌产生毒素的主要原因是缺乏碳源，但补充了高于常规用量的蔗糖之后效果并不理想，而此培养液成份又比较多，用起来不如查彼液方便，查彼液可使

病菌大量产生毒素，对烟苗的损害不仅可通过严格的无菌处理加以消除，还可通过试验设计排除对毒素处理造成的误差。

2. 烟草对毒素快速和强烈反应的意义

本文表明烟草对赤星菌毒素的反应发生迅速、反应强度也很高，这为与病害防治有关的研究提供了基础。目前，抗病基因工程的一条重要途径是利用病原物的毒素自抗基因[3]；在细胞水平上的抗病育种中，病原物产生的毒素常作为抗病性突变的有效因子而受到重视[11,12]；在诱导抗性研究中，毒素也被期望用作增强诱导抗性程度和幅度的有效胁迫因子[4]。根据 Kuc[4]的观点，毒素之所以受到以上三方面研究的重视，主要是因为它可以迅速刺激植物发生强烈反应，从国内对赤星病一直缺乏研究来说，本文的启发意义是明显的。

3. 关于毒素在品种抗病性鉴定中的作用

悬滴接种法也是鉴定烟草品种对赤星病抗性的常用方法[7]，它需要烟苗较大、特殊保湿等条件，而用毒素处理代替悬滴接种，首先具有易于定量、少受苗龄限制等方法上的方便，在不同病害中已建立了一套标准程序[3,13]。更因为烟草对毒素的反应与由悬滴法测定的品种抗病性趋势一致，所以可以保证毒素测定法的可靠性。

参 考 文 献

[1] 周嘉平等，烟草学刊，1990，(2)：17－25。

[2] Scheffer, R. P., Toxins and plant pathogenesis, Academic Press, Australia, 1983, 1－40.

[3] Wernsman, S. A., CORESTA Infor. Bull., CORESTA Symp. 1990, Kallithea, Greece, 1990: 55－84.

[4] Kuc, J. and Preisig, C., Mycologia, 1984, **76**: 767－784.

[5] Yoder, O. C., Ann. Rev. Phytopathol., 1980, **18**: 103－120.

[6] Dong, H. S. and Wang, Z. F., CORESTA Infor. Bull., CORESTA Symp. 1990, Kallithea, Greece, 1990, 184.

[7] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力测定方法的研究，山东农业大学学报，1989，**20**(4)：1－8。

[8] 方中达，植病研究法，北京：农业出版社，1979，87。

[9] 潘瑞炽、董愚得，植物生理学(第二册)，北京：高等教育出版社，1981，34。

[10] Bottini, A. T. et al., Tetrahedron Lett., 1981, 2723－2726.

[11] Yoder, O. C. and Nishimura, S., Host-specific toxins, Tottori Univ. Press, 1989, 153－170.

[12] Hayami, C. et al., J. Fac. Argic. Tottori Univ., 1982, **17**: 9－18.

[13] Mayee, C. D. and Pathak, V. N., Advances in Plant Pathology, Vol. 1. Plant Pathogenesis, Bookman Assoc., 1989.

FAST RESPONSES OF TOBACCO TO TOXIN PRODUCED BY *ALTERNARIA ALTERNATA* IN RELATION WITH IDENTIFICATION FOR RESISTANCE OF TOBACCO CULTIVARS TO BROWN SPOT

Dong Hansong, Qu Jianjun, Wang Zhifa
Wang Shaojie, Liu Guangyu and Yang Hetong

Three culturing solutions were tested for toxin production by *Alternaria alternata* and Ctzap's medium was selected as working medium in the further studies. When the pathogen had been grown in this medium for 28 days, it could produce the highest amount of toxin, indicated by the critical value of toxin activity(TWE50)which was 32. Then the responses of tobacco to toxin in seedling soaking treatment with toxin were compared with that to droplet inoculation to the plant with conidial suspension of the pathogen. The evident responses of seedling to toxin could take place as early as 12hrs after treatment, while that to droplet inoculation as late as 72hrs. Toxin treatment could also induce seedling wilt 36 hrs , and the evident difference in wilt was found between 21 tobacco cultivars tested. The disease resistance of different cultivars determined by toxin treatment was generally identical with that by droplet inoculation.

烟草赤星病菌生长和产孢性状变异的研究

董汉松　曲建军
王兴利　杨合同　王智发

了解病菌培养生物学特性及其变化规律，对进一步研究病菌的病理学特性和病害防治途径，是一项必要的基本工作。鉴于国内对烟草赤星病这方面的研究尚是空白，本文报道有关病菌培养生物学变异方面的研究结果(1988－1991 年进行研究)。

一、材料和方法

1. 供试菌株

赤星菌(*Alternaria alternata*)的 6 个菌株是，TBA6、TBA12、TBA20、TBA25、TBA27 和 TBA28，代表了致病力从弱到强的组成[1]。

2. 烟草品种

为 G140，按以前的方法[1]育苗，继代接种所用烟苗为 6—9 叶期、株高 8—10cm。

3. 继代培养方法

在 PDA[2]平板上每 10 天移一次菌为一代，共 23 代，每代培养 5 天后检查菌落型、面积和产孢等级[3]。

4. 继代接种方法

每一接种-分离回收周期为一代。方法是：第一代将菌株在利福平-PDA(R-PDA)[4]平板上生长 20 天，制备孢子悬浮液、接种烟苗及诱发病害[1]后，取病样在 R-PDA 平板上回收病菌[5]，开始第二代周期，如此共连续 11 代。每代病菌回收后 R-PDA 平板上生长 5 天，测定菌落型、生长量和产孢等级[3]1.3 和 1.4 两项均 5 个重复。

二、试验结果

1. 菌落型

病菌在 PDA 平板上连续继代培养中，菌落形状和颜色相对稳定(图 1)。主要表现是：6 个菌株在各代均形成近圆形菌落；依菌株不同，菌落颜色有灰白、墨绿、黑及黑白相间等，23 代连续培养中各菌株均未发生菌落型变化。相似的情况也发生于连续 11 代的继代接种过程中(图 1)，说明接种和培养的连续交替不影响菌落型。

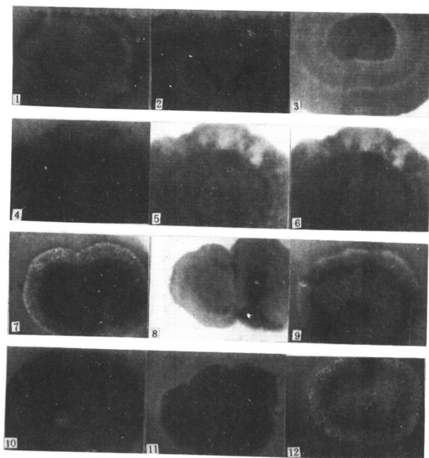


图 1　赤星病菌在继代培养和继代接种过程中的菌落生长情况

Fig. 1　Colony types of *A. alternata* during continuous culture and inoculation on tobacco

1—3，菌株 TBA20，继代接种，依次 1、6、11 代；
4—6，菌株 TBA27，继代培养，依次 2、13、23 代；
7、8，菌株 TBA6，继代接种，分别为 1、11 代；
9、10，菌株 TBA25，继代接种，分别为 1、11 代；
11、12，菌株 TBA28，继代接种，1、11 代。

2. 生长量

病菌菌落形状的稳定与生长量的稳定性有关，圆形菌落的形成是因为病菌在平板上以均等的速度向各个方向生长。病菌生长量的相对稳定表现为，6 个菌株在继代培养和继代接种过程中，菌落面积各以一定的数量范围而浮动(图 2、图 3，虚线)。相对稳定的生长量的大小，依菌株而有不同。菌株 TBA28 的菌落面积多在 10—20cm^2 之间波动，而其余 5

个菌株菌落面积的波动范围主要在 20—40cm^2 范围内。波动范围在 23 代继代培养（图 2）和 11 代继代接种（图 3）中呈近似趋势，无一菌株表现持续上升或下降。

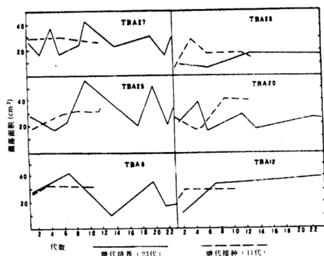


图 2 病菌在继代培养（实线）和继代接种（虚线）过程中的生长情况

Fig. 2 Growth situations of *A. alternata* on culture condition during continuous culture and inoculation on tobacco

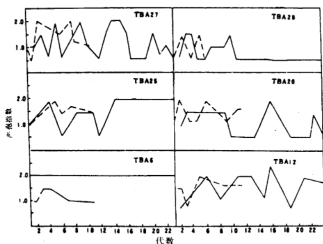


图 3 病菌在继代培养（实线）和继代接种（虚线）过程中产孢能力的变化

（纵轴数字为产孢指数）

Fig. 3 Sporulation of *A. alternata* during continuous culture and inoculation on tobacco

3. 产孢量

病菌菌落颜色的稳定取决于产孢能力的稳定，产孢能力的稳定性也表现为不同菌株在连续培养和连续接种过程中均有一个相对恒定的产孢指数变化范围(图 2、图 3，实线)。在 23 代连续继代过程中，菌株 TBA28 相对恒定的产孢指数变化范围是 0.5－1.0，菌株 TBA20 为 1.0－1.5，TBA12 为 1.5－2.0，TBA25 和 TBA27 为 2.0－4.0，TBA6 为 4.0(图 2，实线)。在 11 代连续接种继代中，不同菌株相对恒定的产孢指数变化范围与继代培养中的测定值相近(图 3，实线)。

三、讨　　论

国外在对烟草赤星病菌较早的研究中，有的结果表明病菌的培养生物学特性易于变异[6]，有的结果提出相反的看法[7]。要得出比较可靠的结论，一是观察变异的试验条件要能反映人工培养与病菌在寄主上的发生之间的差别，只有在有差别的条件下，变异才有可能发生；二是要作长时间的连续观察，以区别真正的变异(能力的变化)与量的变化；三是选择的观察性状要能代表培养生物学的基本特性[8]。

本文以上面三点为依据的研究表明，病菌的生长和产孢能力表现出相对稳定性，既不为连续的人工培养所减弱，也不为连续接种所加强。董汉松和王智发(1989、1990)对病菌病理学[5]和弱毒株诱导的烟草抗病性[9]的研究，不仅表明上述问题，同时也以这一观点为基础。这说明对病菌培养生物学特性的了解，也是进行进一步研究的基础。在这方面，关于病菌生物学性状与致病力的关系也存在不一致的看法，我们将陆续报道这方面的研究结果。

参 考 文 献

[1] 董汉松、王智发，山东农业大学学报，1989，**20**(4)：1－8。
[2] 方中达，植病研究法，北京：农业出版社，1979，82。
[3] 董汉松、王智发，中国烟草，1989，**4**：1－9。
[4] 董汉松等，南京农业大学学报，1989，**10**(1)：46－49。
[5] 董汉松等，山东科学，1993，**6**(2)：10－14。
[6] Hartman. G. C.，Mycologia，1966，**58**：694－701.
[7] Lloyd，H. L.，Nature，1972，**240**：94－96
[8] Lucas，G. B.，Diseases of tobacco(3rd ed.)，BCA，Raleigh，NC，1975，267－296.
[9] Dong，H. S. and Wang，Z. F.，CORESTA Infor. Bull.，CORESTA Symp. 1990，Kallithea，Greece，1990，185.

STUDY ON VARIATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF *ALTERNARIA ALTERNATA* IN CULTURAL AND INOCULATING PROCESS

Dong Hansong, Qu Jianjun
Wang Xingli, Yang Hetong and Wang Zhifa

The observations were made to testify biological variation of *Alternaria alternata*, the pathogen of tobacco brown spot, when cultured and inoculated to tobacco seedlings. The principle properties of pathogenic biology included the colony types, colony area and sporulating capability. Successive culture for 23 generations and successive recovering culture from inoculated and then diseased leaves for 11 generations were carried out. The results indicated a stable expression in the 3 properties showed by 6 virulent strains with different pathogenicity, and no evident variation was found.

烟草赤星病菌致病力变异的研究

董汉松　曲建军
宗树林　王智发　杨合同

病原物致病力的变异不仅是一个重要的病理学特性，还影响研究中菌株的保存、接种体的制备以及病害防治措施的制订[1,2]。本文报道对烟草赤星病菌致病力变异特性的研究结果（1988—1991 年进行研究）。

一、材料和方法

1. 供试菌株

测定的赤星病菌（*Alternaria alternata*）菌株有 6 个：TBA6、TBA12、TBA20 是 1987 年 8 月分离的，TBA25、TBA27 和 TBA28 是 1988 年 7 月分离的，分别代表了致病力弱、中、强的不同情况[2,3]。

2. 供试烟草品种

为 G140，育苗[3]后长到 5—6 叶期、株高为 8—10cm 时用作接种。

3. 变异条件的设计

（1）低温保存：将菌株在 PDA 斜面上于 1—4℃下保存。从 1987 年 4 月到 1991 年 4 月，每 5 个月移植一次，每次移 2 套用于继续低温保存，另一套长到第 20 天用于致病力测定。

（2）继代培养：在 PDA 平板上每 10 天移植一次为一代，共作 23 代；每代长到 20 天时制备孢子悬浮液[3]用于接种。

（3）继代接种：每一个接种-分离回收周期为一代。第一代将菌株在 R-PDA[4]平板上生长到第 20 天制备孢子悬浮液[3]用于接种；诱发病害后取病叶在 R-PDA 平板上分离回收病菌[4]，同时开始第二代周期，如此共作 11 代。

4. 致病力的测定

按文献[3]的方法进行，孢子悬浮液的孢子含量为 10^5—10^6/ml，均接种在烟苗的第 5、6 真叶表面。以上 3 种处理每个菌株每次接种各设 4—5 个重复，结果取平均值。均以灭菌的 1%葡萄糖溶液同样接种为对照。

二、试验结果

1. 低温保存期间的致病力表现

表1是选取强致病力菌株 TBA28 和弱致病力菌株 TBA6 进行统计的结果。两个菌株对烟苗叶片的侵染能力均无变化，引起病斑扩展的能力略有下降，其中以菌株 TBA28 较明显。

表1 赤星菌两个菌株在低温保存期间对烟苗致病力的测定结果

Table 1 Pathogenicity ability of *A. alternata* after cold storage

移植代数	致病力测定的时间(年,月)*	菌株 TBA6		菌株 TBA28	
		病叶率(%)	病情指数	病叶率(%)	病情指数
1	1987,1	38.6	29.0		
2	1987,9	43.8	34.1		
3	1988,2	40.0	34.0		
4	1988,7	未测	未测	分离时间	
5	1988,12	16.7	3.0	100	100
6	1989,5	16.7	4.2	100	90.0
7	1989,10	16.4	6.0	100	83.3
8	1990,3	未测	未测	100	86.7
9	1990,8	16.7	3.3	100	66.7
10	1991,1	16.7	3.3	100	79.2
11	1991,4	16.7	3.3	100	79.2

* 1988年7月前的测定是由1988届毕业实习生陈万昌进行的。

2. 继代培养过程中的致病力表现

图1表明，在23代连续培养过程中，病菌致病力在幼苗病叶率与病情指数两项测定中保持相对稳定。每个菌株各有其基本稳定的数量变化范围，其大小依菌株致病力强弱而异。致病力较强的菌株 TBA28 接种幼苗的病叶率保持100%，病情指数在60—80之间变化。其余5个菌株这两项值分别在60—100%和20—40之间变化，这表明，连续培养不引起病菌致病力的降低。

3. 继代接种过程的致病力表现

在连续11代继代接种过程中，病菌6个菌株的致病力在病叶率和病情指数两项测定中也保持基本稳定(图2)，与继代培养的变化趋势相似。菌株 TBA28 一直保持最高的病叶率和病情指数，分别在接近100%和40左右变化；其余菌株这两项值分别多在70—100%和40以下变化。这说明连续接种并不引起病菌致病力的提高。

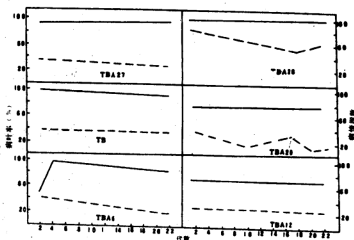


图 1 赤星菌不同菌株在继代培养过程中接种烟苗的病叶率(实线)和病情指数(虚线)

Fig. 1 Pathogenicity ability of *A. alternata* during continuous culture

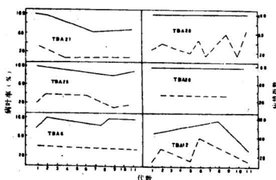


图 2 赤星菌不同菌株继代接种过程中接种烟苗的病叶率(实线)和病情指数(虚线)

Table 2 Pathogenicity of *A. alternata* during continuous inoculation

三、讨 论

1. 以前的研究看法不一

一般认为,许多植物病原真菌由于多核菌丝间的融合和准性生殖,很容易发生变异,病菌在培养基上生长时容易丧失致病力[5,6]。在对烟草赤星病的研究中,不同研究者得出的结论相互抵触。Lloyd[7]认为,病菌若能大量产孢,就可获得很高的致病力,而且致病力高度稳定。Spurr[8]的研究表明,病菌致病力在连续移植中持续稳定。Sobers 和 Doupnik[9]以及 Ram 和 Lucas[10]研究指出,连续继代培养可使病菌迅速丧失致病力。根据 Lloyd[7]的说法,改善培养条件即可改善病菌的致病力。我们研究的结果是,改善培养条件可以使病菌的产孢能力提高[11],但不能使弱毒株变成强毒株[2]。

2. 赤星菌的致病力是稳定的

根据本文的研究认为，赤星菌致病力的变异主要表现为菌株间差别，即存在菌株间的致病力分化，这一点已得到普遍的接受[5,7-10]。本研究表明的另一个重要看法是，病菌某个菌株的致病力是稳定的，既不为连续培养所减弱，也不为连续接种所增强。

3. 致病力变异研究对病害防治研究具有重要意义

董汉松和王智发研究证明，赤星病菌弱毒株能有效地诱导烟草对赤星病的系统抗性[2]，而弱毒株的直接施用是利用诱导抗性防治侵染性病害的途径之一[1]，其首要条件是弱毒株在与寄主的接触过程中不会变成强毒株。

参考文献

[1] 董汉松、王智发. 中国烟草，1990，(2)：10－13。

[2] 董汉松、王智发. 植物保护学报，1992，**19**(1)：87－90。

[3] 董汉松、王智发. 山东农业大学学报，1989，**20**(4)：1－8。

[4] 董汉松等. 山东科学，1993，**6**(2)：15－19。

[5] Lucas, G. B., Diseases of tobacco(3rd ed.), BCA, Raleigh, NC, 1975, 267－296.

[6] Tuzun, S. et al., Phytopathology, 1989, **79**: 979－983.

[7] Lloyd, H. L., Nature, 1972, **240**: 94－96.

[8] Spurr, H. W., Phytopathology, 1972, **62**: 916－920.

[9] Sobers, E. K. and Doupnik, B., Phytopathology, 1973, **63**: 191－192.

[10] Ram, C. V. and Lucas, G. B., Tobacco Science, 1963, **7**: 81－84.

[11] 董汉松、王智发. 中国烟草，1989，**4**：1－9。

OBSERVATIONS ABOUT PATHOGENICITY VARIATION OF TOBACCO BROWN SPOT PATHOGEN

Dong Hansong, Qu Jianjun, Zong Shulin,
Wang Zhifa and Yang Hetong

Six strains of *Alternaria alternata* were tested for their pathogenicity variations during being cold-preserved, successively cultured and successively inoculated to tobacco seedlings. After the pathogen had been cold-preserved for 4 years, it showed no reduction of host-invading capability and slight weakening of brown spot-expanding ability. During successive culture, the pathogenicity of the pathogen was principlly stable indicated by certain ranges of invading ability (IA) and brown spot-expanding ability(EA) to the plant seedlings. The strongest virulent strain TBA28 gave consistantly 100% of IA and 60—80 of EA. Other 5 strains gave 60—100% of IA and 20—40 of EA. The similar tendency was also found in successive inoculation, in which about 100% of IA and 40 of EA were shown by the strain TBA28 and more lower tested values of IA and EA by other 5 strains. These results suggested that neither reduction was caused by successive culture nor enhancement was induced by successive inoculation for pathogenicity of tobacco brown spot pathogen.

烟草赤星病菌孢子萌发和侵染条件的研究

董汉松　曲建军　吕士恩　孙明业　王智发

研究病菌侵染过程中所需的条件，可以了解病原物的病理学特性，并为病害防治等方面的进一步研究提供基础。对烟草赤星病来说，国内对这些方面还缺乏系统了解，国外的有关研究结果又存在一定的不一致[1,2]；而赤星病近年来已成为我国烟草上的主要病害之一[3]。这都表明对病菌的病理学特征有深入研究的必要。本文报道关于赤星病菌孢子萌发和侵染条件的研究结果(1991 年进行研究)。

一、材料和方法

1. 供试材料

病菌菌株 TBA6、TBA19 和 TBA28 分别是 *Alternaria alternata* 的弱和强致病力菌株，按以前所用方法[4]繁殖和制备孢子悬浮液；所用烟草品种为 G140。按以前的方法[5]育苗备用。

2. 孢子萌发条件

分 5 项：①在灭菌蒸馏水中[4]；②在 1%葡萄糖中[5]；③在烟叶表面，用 3—4 叶期幼苗的第 2、3 真叶，按离体叶悬滴法处理[6]；④光照条件，分 24 小时光照和 24 小时黑暗两种处理，按文献[7]的方法进行，上述 4 项处理的温度均为 25℃±；⑤萌发温度，将菌株 TBA28 的孢子悬浮液分别置于 4、14－16、24－25、28－30 和 40℃下萌发。5 项试验中各处理均 3 次重复，定期镜检。

3. 侵染条件试验

在幼苗 5－6 叶期时分作露天放置和温室内放置，15 天后(7－9 叶期)各作叶面清洗和不清洗两种处理。清洗方法是分别用丙酮和 70%酒精淋洗第 5、6 真叶表面。灭菌水冲洗 3 次。然后用菌株 TBA28 的孢子悬浮液按悬滴法接种各处理幼苗的第 5、6 真叶[5]，以 1%葡萄糖(增强展着性)溶液同样接种为对照，每种处理各 5 次重复，诱发病害后检查发病情况[6]。

4. 接种方法试验

分 3 种方法：①孢子喷雾法[8]，用 3WCS-08 型喷雾器；②叶面悬滴法[6]；③菌圆片法。各 5 次重复，以 1%葡萄糖溶液各按上述 3 种方法接种为对照。

5. 叶面微生物的分离与对赤星菌的作用

分离细菌按文献[9]、分离真菌按文献[10]进行；用平板抑菌法[11]测定分离物有无

抑菌作用。

二、试验结果

1. 萌发条件

（1）温度：温度不同可以影响孢子萌发开始的时间（图1、表1）、萌发率（图1）和芽管的生长速度（表1）。

在4℃下孢子从24小时开始萌发；在40℃下不能萌发，在其他3种温度下孢子萌发开始于第4、5小时（表1）。每次检查时，在4—30℃范围内，萌发率随温度提高而呈增加趋势，以24—25℃萌发最好，见图1。在11—12小时，孢子萌发率-温度曲线呈典型的萌发动力学曲线见图2。

温度不同对芽管生长基本趋势是，同一温度下芽管长度随时间延长而增加；同一时间内随温度的（4—30℃）提高芽管的生长也加快。

表1 菌株TBA28的孢子在不同温度下的萌发和芽管生长情况

Table 1 Spore germination and tube growth of *A. alternata* under changing temperature conditions

温度	萌发时间	芽管长度（μm）	
（C）	（小时）	范围	平均
4	4.5—5	0	0
	11—12	0	0
	24—25	13.1—62.88	24.98
	36	15.72—165.06	74.52
	48	15.72—222.7	83.49
	60	39.3—144.1	103.49
	72	10.48—81.22	27.73
14—16	4.5—5	2.62—28.82	10.48
	11—12	1.31—41.92	23.08
	24—25	28.82—123.14	63.10
24—25	4.5—5	44.54—65.5	55.89
	11—12	36.68—3666.8	97.92
	24—25	31.44—432.8	164.0
28—30	4.5—5	9.17—15.98	26.99
	11—12	26.2—183.4	78.99
	24—25	7.86—131.0	44.83
40	4.5—5	0	0
	11—12	0	0
	24—25	0	0

注：各温度各时间均检查50个孢子。

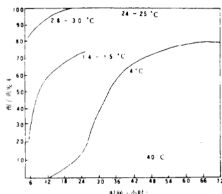


图 1　病菌（菌株 TBA28）在不同温度下的孢子萌发率

Fig. 1 The spore germination under-different temperation conditions

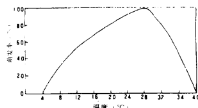


图 2　病菌（菌株 TBA28）在 11－12 小时的孢子萌发率-萌发温度曲线

Fig. 2 The germination-temperature curve at 11－12h of culture

（2）光照条件：两个菌株在有光照的条件下，同一时间内较在黑暗条件下高 30%（TBA6）到 58%（TBA28），见表 2。

表 2　菌株 TBA6、TBA28 在光暗条件下的萌发率（%）

Table 2　Effects of illustration conditions on spore germination of the pathogen

萌发时间（小时）	TBA6		TBA28	
	光照	黑暗	光照	黑暗
4－6	10	4.7	40	5.17
11－13	61.4	33.8	93.3	42.3
24－26	50.7	20.4	100	42.3

注：各检查 50－100 个孢子（表 3、表 4 同）

（3）在 1% 葡萄糖溶液中：在同一时间内，两个菌株在 1% 葡萄糖溶液中比在蒸馏水中的孢子萌发率高约 35（TBA28）－50%（TBA6），见表 3。

（4）在烟叶表面：表 4 指出，两个菌株在烟草幼苗叶片上萌发能力最强，在同一时间内，在叶表的萌发率比在蒸馏水中高 65－94%，而比在 1% 葡萄糖溶液中高 60－90%。

表 3　菌株 TBA6、TBA28 在 1% 葡萄糖中的孢子萌发率（%）

Table 3　Nutrition-conditioned germination indicated by effects of glucan addition

萌发时间（小时）	TBA6		TBA28	
	对照	1%葡萄糖	对照	1%葡萄糖
4－6	10	33.9	6.5	40
11－13	61.4	95.7	58.3	93.3
24－26	50.7	100	85.9	100

表 4　菌株 TBA6、TBA28 在烟叶表面的孢子萌发率

Table 4　The spore germination on tobacco leaves

萌发时间（小时）	TBA6			TBA28		
	水中	葡萄糖中	叶表	水中	葡萄糖中	叶表
4～6	10.0	33.9	100	6.5	40.0	100
11～13	61.4	95.7	100	58.3	93.3	100
24～26	50.7	100	100	85.9	100	100

2. 侵染条件

（1）接种方法和侵染条件对发病的影响：由表 5 可知，各种处理病叶率均为 100%，差异主要表现在病情指数上。用酒精和丙酮清洗的叶片发病较重。在 3 种接种方法中，以悬滴法病情指数最高，其次是菌圆片法，喷雾法最低。当烟苗露天放置 15 天后，接种后病情指数提高约 16%。

表 5　菌株 TBA28 在不同接种条件与方法下的致病情况

Table 5　Effects of inoculation methods on pathogenicity of the pathogen

处理		病情指数	发病率（%）
表面处理	不洗	97.5	100
	酒精洗	100	100
	丙酮洗	100	100
接种方法	喷雾	30	100
	悬滴	73.8	100
	菌圆片	62.5	100
幼苗场所	室内	73.8	100
	室外	90.0	100

（2）叶表微生物类群和数量：叶表分离的结果（表 6）表明，不论是在温室还是露天放置的幼苗，叶面上均有真菌和细菌附着。露天放置 15 天后，真菌和细菌的种类和数量均有所增加；酒精清洗的叶片上，菌的种类和数量均有减少。平板抑菌法测定表明，这些叶表分离物对赤星病菌（菌株 TBA28）无影响（图 3）。

表 6　烟苗叶表面的主要微生物类群

Table 6　Microbe population on tobacco leaves

条件	处理	真菌		细菌	
		菌落种类	数量*	菌落种类	数量*
室外	酒精洗叶	2	2.00×10^2	漏记	漏记
	不洗叶	5	5.06×10^2	5	7.90×10^4
室内	酒精洗叶	2	4.35×10^1	2	3.70×10^2
	不洗叶	2	1.02×10^2	5	3.70×10^4

* 单位是：CFU/cm²

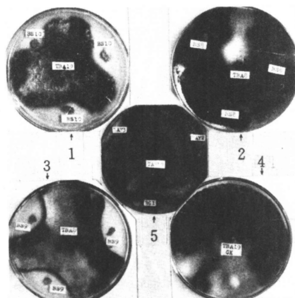


图 3　烟草叶表微生物对赤星菌(TBA8、TBA19)生长的影响

1. 细菌 BS10(*Bacillus* sp.)抑制赤星菌;2. 细菌 BS8 无抑制作用;3. 细菌 BS9 有抑制作用;

4. 赤星菌正常生长状;5. 附生细菌的 3 个分离物,无抑制作用。

Fig. 3　Inhibitory effects on the pathogen growth of microbe from tobacco leaf surfaces

三、讨　　论

(1)本研究提出了我国烟草赤星病菌孢子萌发的基本条件的影响因子。孢子萌发对温度的反应,与 Norse[12]的研究结果基本一致。1%的葡萄糖溶液促进萌发,可能与营养和渗透压的改善有关[12]。孢子在烟叶表面萌发最好,表明了病菌对寄主表面的适应性[12]。关于光照条件对孢子萌发的影响,不同研究结果不一[8],本文表明孢子萌发能力可为光照所加强,但对光照无依赖性。

(2) 对影响侵染的条件进行探讨,可为以病害防治为目的的研究打基础。叶表微生物对病菌致病力的影响,由丙酮和酒精冲洗诱导的感病性[13],都被认为是探讨病害防治途径的突破口,有必要作进一步研究。

参考文献

[1] Lcoyd, H. L., Mycopath. et Mycol., 1972, **47**:317－322.

[2] Sobers, E. K. and Doupnik, B., Phytopathol., 1969, **59**:202－205.

[3] 陈瑞泰等,烟草病虫害防治,济南:山东科学技术出版社,1990,10－17。

[4] 董汉松、王智发,中国烟草,1989,(4):1－9。

[5] 董汉松、王智发,山东农业大学学报,1989,**20**(4):1－8。

[6] Dong, H.S. and Wang, Z.F., CORESTA Infor. Bull., CORESTA Symp. 1990, Kallithea, Greece, 1990.
[7] 董汉松等,莱阳农学院学报,1991,**8**(1):42—46。
[8] Lucas, G.B., Diseases of tobacco (3rd ed.), BCA, Raleigh, NC, 1975, 267—296。
[9] 董汉松等,南京农业大学学报,1987,**10**(1):46—49。
[10] 董汉松等,山东科学,1993,**2**(植物病理专辑):25—32。
[11] Echandi, E., Phytopathol., 1976, **66**:430—432.
[12] Nore, D., Annu. Rev. Biol., 1973, **74**:297—306.
[13] Reuveni, M. et al., Physiol. Molecul. Plant Pahtol., 1987, **30**:441—445.

STUDY ON CONDITIONS FOR SPORULATION AND INVASION TO HOST OF TOBACCO BROWN SPOT PATHOGEN

Dong Hansong, Qu Jianjun, Lu Shien,
Sun Mingye and Wang Zhifa

Two strains of *Alternaria alternata* were tested for their conditions of sporulation and invasion to the host. The best sporulation was obtained when pathogen spores were incubated on leaf surface of tobacco seedling, and the worst on distilled water. The pathogenicity of pathogen was enhanced by washing leaf surface with acetone and 70% alcohol and by exposing the seedlings out of green-house. Three methods of inoculation were tested and droplet inoculation gave the most serious symptom. The components and population of microbes on the leaves and their effects on the host infection by pathogen were analysed.

中国烟草赤星病菌致病力在地理上和品种中分化状况的研究

董汉松　初明光　杨合同　田福海
张修国　王智发　姜广正

一般认为，赤星菌(*Alternaria altenata*)是一个包括各种性状分化的种群，尤其是致病力的地理分化与赤星病发生流行密切相关；这种分化是寄主、病菌和环境因素三方面相互作用的结果。中国是世界上最大的烤烟种植区，种烟地域幅员辽阔、条件各式各样，必然存在病菌地理分化的情况。但对此一直没有研究，本文是力图了解赤星菌的菌源与种烟地理、烟草品种、生态因子的关系等的一部分工作，试图弄清赤星病近15年大流行的原因，同时为根据寄主-病菌群体互作筛选弱毒株用于抗性诱导的研究提供基础。

1988－1992年对来自全国12个主要产烟省的168个菌株进行测定，分析它们致病力分化与品种抗病性的关系，表明：在抗病性强的烟草品种群体上，病菌强致病力菌株发生的比例高，在感病品种上则相反；致病力分化表现出一定的地理分布特征。这对诱导抗性利用途径的启示是：①弱毒株的直接利用是有潜在危险的，尽管室内测定表明赤星菌致病力稳定；②弱毒株或其孢子制剂的直接应用在田间的防病效果可能会因地而异。

一、材料与方法

1. 菌株采集和鉴定

1986－1990年于生长季节从国内11个主产烟省(表1)的4年晒晾烟品种和10个烤烟品种(表3)上采集标本约100份，获得300多个分离物；按形态[3]和致病力测定[4]加以鉴定，其中168个分离物为*Alternaria alternata* (Fries) Keissler。

2. 供试烟草品种

测定菌株致病力用的是烤烟品种G140；品种抗病性测定用了21个品种(表5)，它们是我国目前主要栽培品种。均按以前所用方法[4]培育幼苗至5－6叶期、株高8－10cm时用作接种。

3. 病菌致病力测定

按以前所用方法[5]对168个菌株进行培养、制备接种体、用悬滴法接种品种G140幼苗的第4、5真叶，每菌株接种8－12棵幼苗，诱发病害后分别计测病叶率和病情指数[4]。

4. 品种抗病性测定

用强致病力菌株TBA28接种21个品种的幼苗，每品种3次重复，每次重复5株苗，

每株幼苗各按悬滴法接种第4、5真叶[4]，以1%的灭菌葡萄糖溶液同样接种为对照，诱发病害和检测方法同上。

表1 烟草赤星病菌致病力的地理组成情况

Table 1 Geographical components of pathogenicity of *A. alternata*

自然种植区划[6]	省份	收集菌株数	致病力组成(%)		
			弱	中	强
东北烟区	吉林	20	20.0	35.0	45.0
黄淮烟区	陕西	7	57.1	14.3	28.6
	山东	30	56.7	23.3	20.0
	河南	12	83.4	8.3	8.3
长江中上游烟区	四川	10	40.0	30.0	30.0
	湖北(西部)	15	33.3	40.0	26.7
长江中下游烟区	安徽(滩南)	23	60.9	17.4	21.6
	湖南	9	77.8	22.2	0
	福建	28	71.4	10.7	17.9
西南烟区	云南	2	0	100	0
南部烟区	广东	12	33.3	9.4	57.3
总和	11	168	53.0	23.2	23.8

表2 10个省份赤星病菌致病力的地理分布型和菌株主要来源地的主要气象条件

Table 2 Geographical distribution in relation to annual alternation of climates in 10 provinces of China

地区	病菌致病力分布型	病害盛发期	发病盛期的平均温度(C)	发病盛期的平均降雨量(mm)
广东 阳春	强	6月	26±	600±
吉林 龙井	强	8月中至9月中	18±	160±
四川 什坊	中	6月下至7月	20±	300±
陕西 径阳	中	8月	24.5±	108±
湖北 襄樊	中	7—8月	24±	230±
安徽 凤阳	中	7—8月	24±	320±
山东 潍坊	中	7—8月	24±	260±
福建 龙岩	弱	6—7月	25.5±	650±
河南 登封	弱	7—8月	26.5±	200±
湖南 郴州	弱	6月下至7月	28±	320±

注：温度和降雨量为年度间的平均值。

5. 田间调查

1986—1990年每年6—9月去不同省份的标本采集地(表2)调查发病期和气象资料，

或向有关单位加以征集。

二、结果与分析

1. 病菌致病力的地理分布

根据测定，将病菌的致病力组成分为 3 种情况：①强致病力菌株，接种后引起发病的病叶率在 80%以上，或病情指数为 50 以上；或病叶率为 60－80%，同时病情指数为 35－50；②弱致病力菌株，病叶率低于 30%，或病情指数低于 15；③中致病力菌株，属于以上测定值范围之间的菌株。

表 3 烟草赤星病菌致病力在不同品种中的发生情况

Table 3 The pathogenicity components of the fungi in tobacco cultivars with different degrees of resistance to brown spot

烟 类	品 种	收集的菌株数	致病力组成(%)		
			弱	中	强
晒 烟	粤白 2 号	14	42.9	7.1	50.0
	马里兰 609	9	44.4	11.2	44.4
晾 烟	沙姆逊(香料烟)	3	(33.3)	(0)	(66.7)
烤 烟	NC89	24	30.5	39.1	30.4
	中烟 15	10	10.0	40.0	50.0
	云烟 2 号	2	(0)	(100)	(0)
	Coker 176	10	60.0	30.0	10.0
	H423	7	71.4	29.6	0
	金星 6007	4	(25.0)	(50.0)	(25.0)
	KY17	7	85.7	14.3	0
	永定 1 号	14	71.4	21.4	7.2
	Coer258	4	(75.0)	(25.0)	(0)
	K326	4	(75.0)	(0)	(25.0)
	G140	56	46.2	28.8	25.0
总 和	14	168	53.0	23.2	23.8

从全国范围看，53%的菌株为弱致病力型，中、强致病力菌株各占 23%(表 1)。据表 1 的结果，10 个省(除云南外)的菌株致病力明显地表现为 3 种地理分布(表 2)：①强致病力分布型，50%以上的菌株表现出强或中等致病力，其中强致病力菌株占 40%以上，有吉林和广东 2 省；②中致病力分布型，中、强致病力菌株占 40%以上，其中强致病力菌株占 20%以上，包括陕西、山东、四川、湖北和安徽 5 省，它们分别属于长江和黄、淮河流域的烟区；③弱致病力分布型，弱致病力菌株占 70%以上，强致病力菌株占 20%以下，包括 3 省；其中福建和湖南分别属于长江中下游烟区的江南丘陵山地烤烟晾烟亚区和湘闽丘陵晒烟烤烟亚区。

表 4　病菌菌株主要来源地的烟草品种种植情况

Table 4　Planted cvs in the areas where the pathogen strains were collected

地点		种植的主要品种	
		烟　类	品　种
吉林	和龙县	烤烟	中烟 15、NC89
	龙井市	烤烟	中烟 15、NC89
山东	潍　坊	烤烟	G140
	临　沂	烤烟	G140
河南	登　封	烤烟	Coker258(C258)
福建	龙　岩	烤烟	C258、C176、KY17、K326、H423、金星 6007、永定 1 号
		晾、晒烟	沙姆逊、粤白 2 号
安徽	凤　阳	烤烟	C176
湖北	襄　樊	烤烟	NC89
广东	阳　春	晾、晒烟	徐闻香料烟、粤白 2 号
湖南	郴　州	烤烟	KY17、H423、K326、G28、长脖黄、红大

表 5　烟草不同品种在人工接种条件下的抗病性测定结果

Table 5　Brown spot resistance of tobacco cvs identified with artificial inoculation

品　种	发病情况		抗病性	
	病叶率(%)	病情指数	抗侵染1)	抗扩展2)
NC95	36.0	36.7	2.78	2.72
长脖黄	35.2	35.0	2.84	2.86
永定 401	46.8	33.3	2.14	3.00
NC326	31.5	31.7	3.17	3.15
永定 1 号	29.3	30.0	3.41	3.33
G140	55.8	28.3	1.79	3.53
K326	37.0	26.7	2.70	3.75
中烟 14	41.7	25.0	2.40	4.00
大黄金	37.0	25.0	2.70	4.00
云烟 2 号	26.4	23.3	3.79	4.29
白肋 21	46.8	23.3	2.14	4.29
G80	20.0	23.8	5.00	4.20
红　大	36.4	20.0	2.75	5.00
中烟 15	30.2	22.0	3.31	4.55
G70	21.7	20.0	4.61	5.00
NC82	17.2	21.7	5.81	4.61
NC89	17.2	21.7	5.81	4.61
K394	21.2	18.3	4.72	5.46
G28	15.4	18.3	6.49	5.46
中烟 86	28.3	16.7	3.53	5.99
Coker319	16.7	13.3	5.99	7.52

1)抗侵染：100/病叶率；2)抗扩展：100/病情指数。

对病菌致病力的地理分布与主要气象因子的关系也作了初步分析(表 2)。中致病力分布型省份的基本特点是,病害盛发期温度平均为 20－24℃左右、旬降雨量约 60mm;强致病力分布型地区雨量和温度最高(广东)或最低(吉林);温度较高是弱致病力分布型地区的主要特点。

2. 病菌致病力在不同品种中的发生

强致病力菌株主要发生在晒烟品种粤白 2 号、马里兰 609 和烤烟品种中烟 15 和 NC89 的群体中(表 3)。这两类品种分别是强致病力地理分布型的广东和吉林的主要栽培品种(表 4),中、弱致病力菌株主要发生在 G140 和永定 1 号等烤烟品种中(表 3),它们是中致病力地理分布型省份的主要栽培品种(表 4);弱致病力分布型的福建和湖南 2 省主要调查地种植的品种较杂。

病菌致病力在不同品种中的发生情况与品种抗病性有密切关系。表 5 将测定的 21 个品种按抗病性从低到高的顺序加以排列,发生强致病力菌株频率较高的品种中烟 15 和 NC89 抗侵染和抗病斑扩展的能力均较强;发生中、弱致病力菌株频率较高的品种 G140 和永定 1 号表现出中等水平的抗病斑扩展能力,而抗侵染的能力则较弱。

三、讨　　论

(1) 目前世界上对烟草赤星病流行学的研究,趋向于以世界菌源和品种抗源的分布与利用为重点[7,8]。本文首次提出了我国烟草赤星病菌致病力的地理分布和在不同品种中的发生特点,并初步涉及到品种抗性和品种抗源分布,这对国内菌源和品种抗源的分析和利用等方面的研究,是一个有意义的开端。

(2) 病菌致病力的地理分布型取决于 4 方面的因素:一是烟区气象条件对病菌生物学的影响;二是气象条件对病害流行的影响;三是栽培品种的抗病性;四是病菌与寄主接触的频率。赤星病菌的孢子萌发条件是低中温(21－22.5℃)和高湿(相对湿度 80%以上)。芽管侵入和病害扩展需中温(24℃)和低湿条件[9,10]。在病菌与寄主可以发生频繁接触的条件下,抗病品种的栽培和不利于病害流行或病菌侵染的环境条件,是强致病力菌株发生的基本条件。这也是病原-寄主共同进化的表现[11]。本文的试验结果进一步说明了这一点。

(3) 强致病力菌株主要发生在抗病品种中这一结果表明,有效的抗源应从强致病力地理分布型的烟区寻找。这对抗病育种中抗病基因的选择和利用有重要的指导意义,品种抗源研究应与菌源研究同时进行。我们将陆续报道这方面的研究结果。

参 考 文 献

[1] 陈瑞泰等,烟草病虫害防治,济南:山东科学技术出版社,1990,10－17。
[2] 董汉松、王智发,烟草侵染性病害防治面临的难境与对策,中国烟草,1990,**2**:10－13。
[3] Simmons, E. G. et al., Mycologia, 1967, **59**:67－92.
[4] 董汉松、王智发,烟草赤星病菌致病力测定方法的研究,山东农业大学学报,1989,**20**(4):1－8。
[5] 董汉松、王智发,烟草赤星病菌不同菌株在 11 种培养基上的生长产孢能力,中国烟草,1989,(4):1－9。

[6] 陈瑞泰等，中国烟草栽培学，上海：上海科学技术出版社，1989，7－25。
[7] Severson, B. W. et al., CORESTA Inf. Bull., CORESTA Symp. 1990, Kallithea, Greece, 1990, 55－84.
[8] Smeeton, B. W. et al., CORESTA Inf. Bull., CORESTA Symp. 1990, Kallithea, Greece, 1990, 179.
[9] Lucas, G. B., Diseases of tobacco(3rd ed.), BCA, Raleigh, NC, 1975, 267－296。
[10] Spurr, H. W. et al., Phytopathol., 1972, **62**: 916－920.
[11] Van der Plank, J. E., Principles of plant infection, Academic Press, New York, 1975.

OCCURRENCE IN TOBACCO CULTIVARS AND GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF *ALTERNARIA ALTERNATA* IN CHINA

Dong Hansong, Chu Mingguang, Yang Hetong, Tian Fuhai, Zhang Xiuguo, Wang Zhifa and Jiang Guangzheng

More than 300 isolates of *Alternaria* spp. are obtained from about 100 samples collected from 14 cvs of *Nicotiana tabacum* in 11 provinces which are the main areas of tobacco production and subordinated to 6 geographical districts in China. Of the isolates, 168 strains were identificated as *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, the pathogen of tobacco brown spot. The pathogenicity compositions of these strains are studied by artificial inoculation with an attempt to testify the geographical distribution and occurring situation on tobacco cvs of the pathogen. Three models of geographical distribution of pathogenicity are established. The model of strong pathogenicity is characterized as Guangdong and Jilin provinces for their strain components, of weak pathogenicity as 3 provinces which are Fujian, Henan and Hunan, and of middle pathogenicity as 5 provinces which are Sichuan, Shanxi, Hebei, Anhui, and Shandong. Based on the observations on the plant cvs planted in 11 provinces and the examinations to the brown spot resistance of 21 cvs, a tendency is suggested that the strains with strong pathogenicity are mainly from tobacco cvs with stronger resistance to the disease, which are NC89 and Zhongyan 15 belonged to flue-cured type and Aobe12 and Maryland609 belonged to sun- and air-cured type of tobacco. The contributing factors for the occurrence in cvs and geographical distribution of pathogenicity of the pathogen are discussed based on the comprehensive analysis about cultivar planting, brown spot epidemic and related climatic conditions in 11 provinces.

第四部分　烟草诱导抗病性

烟草抗赤星病诱导研究的近期进展

董汉松　刘爱新

一、背　景

对以抵抗赤星病为主的烟草诱导抗病性及利用途径的研究有两个立足点。一是生产实践需要，包括3方面的要点。①赤星病自80年代以来在全国烟区发生普遍，对烟叶产量和品质的影响日趋严重，成为制约烟草生产维持和发展的一个主要障碍；花叶、黑胫、低头黑、野火等病也是烟草上的重要病害，它们被作为利用诱导抗性进行控制的几种目标病害。②生产中采取的防治措施存在多种局限和缺点，一直难以收到理想效果。③有效的病害控制对策和措施已成急需，它必须同时兼顾治病、安全性、无公害要求，并能保持原有烟叶产量、品质等的好性状或对它们能有改进[1]。

二是在理论上，也是自80年代以来，诱导抗性被作为病害治理的一种新途径、新对策来研究，吸取分子生物学、植物-病原物互作、植物病害生理生化、免疫学、电生理学、植物抗病细胞工程和基因工程等学科和技术领域的观点，比较系统地构架出可以作为诱导抗性利用根据的理论体系。人们设想依据诱导抗性发生机制的层次性，通过不同途径把它用于病害控制，目前提出和试验的途径主要有6条。

在烟草上，对抗病毒的诱导抗性研究是一项进行较早、也是对植物诱导抗性的理论发展做出重要贡献的领域，主要集中在NN型香料烟上，对烤烟以诱导抵抗霜霉病的研究比较引人注目。我们对烟草抗赤星病诱导及诱导抗性利用途径的研究，特色或新的意义是：①中国烟区是世界上赤星病最重的烟区，但对抗赤星病的研究在我们的报道之前一直是空白；②试图根据植物-病原物互作和识别，构架机制方面的理论体系；③也是根据植物-病原物互作，试图形成利用诱导抗性控制以赤星病为主的烟草主要侵染性病害的途径。以下是这些方面研究进展的简单总结。

二、抗赤星病诱导的生物学

在形成试验测定体系的基础上建立了烟草抗赤星病诱导的诱导因子谱，明确了各类因子抗性诱导作用的生物学特性。

测定体系中的主要环节包括：①针对不同因子和不同利用途径，使用便于快速鉴定诱导抗性表现程度的方法；②对不同因子确定一种最有效的诱导处理方法、诱导时间和反映诱导抗性强弱的挑战接种时间；③抗性诱导效应指数的确定方法要能反映烟草抗病性的

真实情况(赤星病是一种叶斑型病害,诱导抗性表现为叶斑面积的减小或病情减弱);①用局部诱导、全株测定的方法,验证诱导抗性的系统性。

经对来自全国12省(区)及希腊 Thenssaroniki 烟草上的209个赤星菌株、非病原细菌50多个菌株、6株病毒、14种化学物质进行筛选测定,建立了烟草抗赤星病诱导的诱导因子谱。病菌40多个弱毒株、细菌菌株P1、番茄条斑病毒弱毒株N14和黄瓜花叶病毒(CMV)的卫星病毒SV52、化学物质ID1可明显诱导烟草对赤星病的系统抗性,抗性诱导效应多为60—80%。它们的作用有4个基本特点:①烟草接受诱导刺激的方式与受病菌侵染的方式有关,在茎部或叶部注射、破伤、叶面悬滴或喷洒、灌根6种诱导接种(处理)方法中,叶面悬滴和喷洒效果最好;②诱导抗性的表达经历诱导期、最大期、持久期3个阶段,依诱导因子的不同分别为2—7、10—15、28—50天,重复诱导可延长持久期;③诱导抗性表达的程度主要受诱导刺激的强弱和诱导期温度的影响;④诱导抗性都是系统性的。

三、抗赤星病诱导的机制

初步研究、了解并构架了烟草抗赤星病诱导的3个层次的机制,它们说明了以下关系:抗性诱导是改变寄主-病原物互作的过程,诱导抗性也按寄主-病原物互作的不同的层次实现。

1. 群体互作及其功能歧化

这包括两层含义:①群体水平上的互作是产生具有抗性诱导能力的弱毒株的基础;②强、弱毒株都具有与烟草发生前期互作的能力,但前者能把互作继续发展为建立寄生关系并使寄主发病,后者在给予寄主刺激之后就停止互作朝寄生关系方面进展,而这个刺激可以诱导烟草的抗病性。

对来自全国12个主要产烟省的168个菌株(*Alternaria alternata*)进行测定,分析它们致病力分化与品种抗病性的关系,表明:在抗病性强的烟草品种群体上,病菌强致病力菌株发生的比例高,在感病品种上则相反;致病力分化表现出一定的地理分布特征。这对诱导抗性利用途径的启示是:①弱毒株的直接利用是有潜在危险的,尽管室内测定表明赤星菌致病力稳定;②弱毒株或其孢子制剂的直接应用在田间的防病效果可能会因地而异。

但是,弱毒株并不是在互作的每个环节上都无效,一个表型指示是:它们可以在接种条件下穿透叶片而在接种点背面生长出菌丝,但随后不导致病斑的形成或病斑很小;芽管对叶片的附着和微弱穿透可以不经过菌丝在背面生长就能诱导烟草对赤星病的抗性。致病力低的主要表现有二:①孢子芽管穿透叶片的能力和诱发病斑的能力降低或丧失;②产生AT毒素的能力严重减弱或丧失。体外测定表明,强、弱毒株产生蛋白酶和几种细胞型降解酶的能力无一致差别,这除说明AT毒素的产生能力是致病性的一个关键因子(已被广泛接受)外,还表明细胞壁降解酶最多只是在植物体上才对致病力有作用。

2. 接触识别导误与激发子的作用

这是说不同因子诱导烟草可引起赤星菌侵染前行为的变化和失误,这种失误与烟草抗病性增强之间呈正相关的关系。起导误作用的生物体因子有病菌的弱毒株、非病原细

菌、病毒；化学物质中 ID1 在这方面的作用十分明显。"接触识别导误"是一个套用的术语，目前还没有提出关于烟草与赤星菌接触识别的系统证据。

在使用的生物体中，病菌弱毒株有两种状态的成份看来与接触识别导误有关，一是扩散性吸附素(adhesin)，二是细胞壁组分。吸附素指植物或病原物产生的可以使双方发生细胞联结的任何物质[2]，是一个很宽泛的概念。在赤星菌与烟草的接触阶段，吸附素可由强、弱毒株产生，很明显在功能上是不同的；更有意义的是，当烟草经不同因子诱导后，用作挑战接种的强毒株其吸附素产生量明显降低、甚至完全丧失产生这种物质的能力。对第二类物质即细胞壁组分，当它是粗提物时，只有弱毒株来源的才显示明显的抗病诱导作用，而来自强毒株的这种物质和强毒株孢子及菌丝体一样不显示这种功能；但当初步降解后，无论来自弱毒株还是强毒株，这种物质都有明显的效果。这说明了以下可能：①在自然条件下，弱毒株的这类激发子具有可以被寄主识别的结构，而强毒株的则没有；②弱毒株可以自行释放或由 PRP 类酶降解释放出这种激发子，而强毒株则不能。对这两点都尚需研究证实。

非病原细菌的抗性诱导作用看来与它们的胞壁多糖有关，脂多糖和胞外多糖几乎显示同等的作用。其中的机制是可以推论的，如这两类糖都含有特异结合能力的残基，但还没有拿到证据，即使是所用的非病原细菌，也至少包括两个常见的种。

包括吸附素、细胞壁结合物质、植物来源的聚半乳糖醛酸在内的 3 类激发子，都有诱导烟草抗赤星病和特定 PRP 积累的能力，说明烟草对赤星病的抗性和其他病害体系的诱导抗性一样，可以由多种激发子刺激而发生。下一步的工作首先是要对这些激发子进行定性，然后明确哪一种是主要的以及它所带动的信号传导是怎样运转的。

3. 按接触后识别发生的诱导

病菌强毒株产生的 AT 毒素以生化上的一个单因子与寄主细胞膜上它的受体分子发生分子识别，引导寄主一系列的病理学反应。在烟草幼苗上，AT 毒素有引发寄主快速和强烈反应的能力，这是它用作抗性诱导因子并把 SV 变异和毒素胁迫诱导相"加权"的基础。在表型上，AT 毒素诱导的系统性诱导抗性比弱毒株孢子诱导的高 30－70％，最高时可使烟草表现为免疫(抗性诱导效应为 100％)。

四、诱导抗性的利用途径和多抗作用

根据对以上层次机制的研究，试验建立了可望用于生产的利用诱导抗性防治烟草赤星病和其他主要病害的 3 条途径(第四部分)。

1. 诱导因子直接应用的途径

研制了 3 类诱导免疫制剂：非病原菌(P1)制剂 PCB1、病菌弱毒株(TBA16)孢子壁制剂 PCF1、孢子壁的激发子组分和化学诱导因子 ID1 相结合的制剂 SRS，经一系列温室内测定后转入田间试验(1992－1994)，表明它们在田间有 3 种作用。①控制赤星病：以 SRS2 效果最好，在烟草生长前、中、后期的防病效果大致为 65％、75％、85％，最高可达 90％以上，各期效果比菌核净高 15－30％；②增产作用：SRS2 可使(烘烤后)烟叶增产 47－

110%；③改善烟叶品质、增加上等烟比例、提高产值：与菌核净和不施药的对照相比，SRS2 中的激发子成分可使烟叶内在品质得到改善，在收购的外观品质上也优于施用菌核净的烟叶；上等烟叶比例提高近 13－27%；烟叶均价提高 13－43%；亩产值提高 79－136%以上。

2. 体细胞无性系变异（SV）及诱导抗性由种子向后代传递的途径

试验按两条路线进行：①诱导抗性通过组织培养向再生植株及其后代转移，期望组织培养中的 SV 能改变诱导抗性非遗传表达的特点而在后代植株上稳定表达，同时期望 SV 中的抗病性变异与存在于外植体中的诱导抗性相加而提高抗性程度；外植体取材于病毒因子诱导的植株；②按抗病细胞工程的一般程序，把 AT 毒素用作诱导抗病愈伤组织、抗病细胞系的胁迫因子，产生抗病的再生植株和种子。

据此对生产推广的 4 个优质感病品种（NC82、NC89、K326、中烟 86）进行抗病性改造，AT 毒素胁迫愈伤组织后可获得 19－50%的抗病细胞系；在测定的再生植株中，抗病性明显提高的植株占 42（NC89）－44%（中烟 86），表现为侵染率降低和病斑面积减小。按第二条路线所作的试验建立了易于操作并有利于增强抗性变异和定向选择的条件：①用不同方法证明 AT 毒素有很强的热稳定性，可在愈伤组织培养基灭菌前加入；②毒素重复胁迫可提高抗病变异的频率，两个循环较一个循环胁迫培养抗病再生植株增加 36－38%；③在 SV 和毒素胁迫的变异中，再生植株表现 3 类形态畸变，它们在移栽前就有表现，并且不能在生长过程中恢复正常，对畸变植株的汰除可在移栽时进行。用这两条路线已对 NC89 作了系统改造，获得了抗病的 3 个无性系（表 1）。

3. 多抗作用

以选定的另两种真菌性病害、一种细菌性病害和 TMV 花叶病为指示，测定明确了不同诱导因子诱导的抗病性和诱导抗性的不同利用途径不仅可以抵抗赤星病，还有程度不同的多抗作用，虽然并不是所有测过的诱导因子和利用途径对各种目标病害都有效。这提出了一种希望：利用诱导抗性实现多病兼治的目的是可能的。

表 1　3 个抗病无性系的产生情况

Table 1　Production of 3 somaclones with enhanced resistance to brown spot

无性系名称	产生路线	诱导因子	PRP 组成性表达
NC89-TT	第二条	AT 毒素	++
NC89-V1	第一条	N14	+
NC89-V2	第一条	SV52	+

五、展　望

根据以上研究，我们提出了一个“双向激发子-受体分子”互作模式（粗略轮廓图见本文英语稿）：①初级刺激由外源（一级）激发子完成，激发子或是吸附素中的扩散性分子，它

可以传导；或是细胞壁上的结合分子，它能被释放出来而扩散，或与寄主受体分子识别给予寄主一个刺激信号；②PR 基因受刺激而活化表达，PRP 积累；③PRP 中的酶降解病菌或寄主细胞壁，释放二级(内源)激发子；④二级激发子对寄主再发生持续刺激，使诱导抗性持续表达，这是一个已被证实的现象。对比我们在第一部分有关篇目中的讨论，这个模式只能是下一步研究的一个指导思路。

PRP 是我们研究烟草抗赤星病诱导机制的一个出发点：①酶类 PRP 降解细胞壁释放二级激发子的作用及非酶类 PRP 对接触"识别"的可能影响各具不同的意义；②PRP 诱导的正向和反向因子作用的动态是研究所谓第三套基因(*set*-3)的一个很好的表型，与此相似；③PRP 在上述 3 个无性系中组成性表达的不同，具有 *set*-3 所包含的进化论和遗传运作机制的意义。第一章有关篇目对这些问题已作了细致讨论，此处不再详述。

参 考 文 献

[1] 张永耀、孙立松、卜晓东、姜　荣、董汉松、张建华，津巴布韦烤烟生产技术，上海：上海科学技术出版社，1992。

[2] Dong, H. S., Liu, A. X., Contact recognition and latently systemic infection in Chinese cabbage soft rot: A view from the studies in China. In Plant Pathology and Biotechnology (Li, D. ed.). Shanghai: Shanghai Sci. Tech. Pub., 1994, 53－71.

[3] Gabriel, D. W., Rolfe, B. G., Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. Annu. Rev. Phytopathol., 1990, **28**: 365－391.

RECENT ADVANCES IN STUDIES ON INDUCED RESISTANCE OF TOBACCO TO BROWN SPOT

Dong Hansong and Liu Aixin

1. The background

According to a recent investigation, there are 68 species of infectious diseases infecting tobacco in China. Complex diseases caused by viruses, brown spot, black shank, bacterial wilt, and root knot are widely epidemic and seriously damaging. These have been the case since 1980s. Induced resistance of tobacco to brown spot and other 4 diseases was studied, in our laboratory, primarily for the practical purpose of nonpesticide control of the diseases, which has lead to the establishment of 3 approaches of utilizing induced resistance to control these major diseases. The application ways are based on the mechanisms of induced resistance, which have been understood at 3 levels.

2. Biology of the induced resistance

In this program, four categories of inducers are tested (Table 1). They show 4 aspects of common characteristics. First, their inductory effects are correlated to the form

of the pathogen, *Alternaria alternata*, to invade tobacco. In 6 methods of induction treatments, the best effect is always given by the methods of contacting the inducers with leaf surfaces of the plants, such as leaf droplet or spraying. Secondly, different inducers differ in the 3 time parameters, i. e. inductory duration, the biggest effect stage and lasting period of the resistance. When the hypovirulent strains of brown spot pathogen are used as inducers, repeated induction can enhance the degree and extend the period of induced resistance, but the effect of repeating induction is not unlimited. Three times of repeating induction show the best effects in both increasing the degree and enlonging the period of induced resistance, while 4 times result in decreasing the degree of resistance. Thirdly, the inductory effects are mainly conditioned by intensity of the inductory stress, such as conidial amounts of the fungal inducer, and temperature in the inductory period. Lastly, all of the inducers can elicit systemic resistance of tobacco.

Table 1 Inducers used for tobacco resistance to brown spot

Category	Number tested	Inductory effect (%)[1]	The best inducer	Reference
A. alternata	209st[2]			Part4,
virulent	42st	0−50		this
hypovirulent	119st	29−80	TBA16	book
Bacteria	52st	20−50	P1[3]	
Virus	6sp[4]	10−83	N14, SV52[5]	
Chemical	14sp	7−86	ID1	

1) reduction of disease severity; 2) strain; 3) *Pseudomonas* sp.; 4) species; 5) N14 = hypovirulent tomato streak TMV, SV52 = satellite RNA-containing CMV.

3. The mechanisms

Mechanisms of induced tobacco resistance to brown spot are researched and generalized at 3 levels: the popular host-pathogen interaction, induction of mistakes in the contact recognition, and resistance induction in form of post-contact recognition. The critical indication of these mechanisms is that the elicitation of induced resistance is a process of alternating the properties of host-pathogen interactions, from compatibility to incompatibility.

3.1 The popular interaction and its functional divergence

This includes two respects. The popular interaction is the basis of occurrence of the hypovirulent strains to be used as inducers. Both the virulent and hypovirulent strains possess capability of accomplishing the early interactions with the plant, but differ in the coming events. The virulent strains can continue the interaction to establish parasitive relations with the host, but the hypovirulent strains stop interacting after giving

host a stimulation which is sufficient to induce resistance of the plant.

Based on researches about the occurrence in tobacco cultivars and geographical distribution of components of *A. alternata* in terms of pathogenicity differentiation, the host-pathogen interactions at popular level are characterzed as two aspects. The first one is that highly virulent strains occur at high frequency in resistance cvs and hypovirulent ones at high frequency in susceptible cvs. The second aspect is the evident difference of geographical distribution which is divided into three models. When the computer classification methods are used for analysing the popular interaction, it is found that complicated factors be involved in the formation of the interactions. The significant factors include climate difference, resistance of cvs and period of being planted, and situation of pesticide application. Three indications can be obtained from such popular interactions: ① concernment of safe and nonpolluted management of diseases should be awarkened; ② cares should be taken when the hypovirulent strains are tried to be used directly in the fields, and ③ difference of disease control effects by the hypovirulent strains would exist in different regions.

As regards to the functional divergence of interactions of virulent and hypovirulent strains with tobacco, a critical view is that the hypovirulent strain is not completely defective in all process of the interaction (Table 2). They can penetrate the plant leaves but not lead to the spot formation, comprehensively showing decreased or defective pathogenicity. No differences are between virulent and hypovirulent strains in production of adhesin, cell wall degrading enzymes, chitinase and protease. The only evident difference is the ability of producing AT-toxin. For both virulent and hypovirulent strains, the host-pathogen interactions are assumed to be the same at least in the process of the adhesins to take roles in adsorption of the spores to the plant surfaces. The functional divergence occurs only after the contact stage.

Table 2 Expressions of functional divergence in host-pathogen interaction by virulent and hypovirulent strains of *A. alternata*

Phenotype	Virulent strain	Hypovirulent strain
Pathogenicity	+	−/d(decreased)
AT-toxin	+	−/d
Protease	+	+
Cellulase	+	+/d
Pectinase	+	+/d
Chitinase	+/−	+/−
Contact recognition[1)]	+	+
Adhesin	+	+

1)The results have not been published and also not presented in this book.

3.2 Induction of mistakes of the contact recognition

Resistance induction in form of the host-pathogen contact recognition is evidenced by testing the correlations between the induced mistakes of the contact recognition and degree of induced resistance. Such mistakes express in 7 types and can be induced by the hypovirulent strains, nonpathogenic bacteria, viruses, and chemicals, and result in defective or reduced pathogenicity of the pathogen.

It is proved that surface components of both the hypovirulent pathogen and nonpathogenic bacteria are responsible for the contact recognition and mistake induction, which is accomplished on the *planta* and expressed by alternations of preinfection behavious of the virulent pathogen strains which are used as the challenger. In the case of bacteria to be used as inducers, equal effects can be acquired by the lipopolysaccharides (LPS) and extracellular saccharides (EPS), which have been proved to be the bacterial cognon in some interactions of plant-bacterial systems (Dong and Liu, 1994). More interesting is the case of the hypovirulent pathogen as inducers. Two kinds of elicitors have been evidenced to take roles in elicitation of induced resistance of tobacco to brown spot, being correlated to the mistake induction. One is the adhesin motioned above and the other the cell wall-bound components of the fungal spores. Both of them remain to be known biochemically.

Responses of tobacco to the induction treatments are studied mainly on the elicitation and accumulation of pathogenesis-related proteins(PRPs). At least 9—14 bands are electrophoretically identified, of which 3 PRPs are strongly enhanced by different inducers including the elicitors. Also, evident decrease of the PRP accumulation can be induced by some inducers, which include parts of the virulent and hypovirulent *A. alternata*, nonpathogenic bacteria and chemicals showing phenotypically inductory effects of susceptibility of the host to the disease.

3.3 Resistance induction in form of post-contact recognition

This indicates the role of AT-toxin, produced by *A. alternata*, to elicit resistance of tobacco to brown spot when used as inducer. Inductory effects of the toxin are similar to the fungal spores as inducers when challenge is made 6 days after induction and can reach to the immunity level (100%) when challenge 12 days. Based on the studies and hypothesis of other pathologists , it is believed that the ligand-receptor binding between the toxin and sulfhydryl-protein of tobacco protoplastic membrane, normally as an event leading to the pathogenesis, be responsible for elicitation of induced resistance which is shown by countering the challenger, the virulent strain of *A. alternata*. When the toxin is used as the pressure in tobacco tissue culture to regenerate the resistant somaclones, the mutation of increasing tobacco resistance is most likely contributed by such ligand-receptor recognition as a stress signal. This has been taken as a way of applying the induced resistance and called SV way.

4. Application approaches

The 3 ways of applying induced resistance to control brown spot and other 4 diseases have been explored, i. e. direct application of the inducers and two approaches based on the SV way.

4.1 Direct application

This way has resulted in a preparation, called SRS2. The preparation is made of the elicitor components from spore walls of the hypovirulent strain TBA16 combining the chemical inducer ID1, and gives 60—90% diseases control effects in the most field tests and significant quality improvement of the cured leaves in all of the fields.

4.2 The SV way

It is accomplished in two approaches. The first one is by normal cellular engineering method with AT-toxin stress, and has produced one resistant somaclone NC89-TT from the parent cv NC89. The second approach is that the induced resistance is transducted to the progenies of the tissue culture-deriving regenerants from cv NC89 plants which have been induced in advance by viruses, and has produced two resistant somaclones NC89-V1 and NC89-V2. All of the 3 somaclones are tested for their brown spot resistance in both the first and second progenies of regenerants and resistance to other 4 diseases (Table 4) in the second progeny. Production situations of the 3 somaclones are listed in Table 3, in which the constitutive accumulation of PRPs is also included.

Table 3 The resistant somaclones from the SV way

Somaclone	Production way	Inducer	PRP[1)]
NC89-TT	Tissue culture with AT-toxin stress	AT-toxin	H
NC89-V1	Resistance transduction	N14	L
NC89-V2	Resistance transduction	SV52	L

1) H=high degree of constitutive expression; L=low degree.

4.3 Effects of induced resistance to counter other diseases

Multi-resistance effects can be given by each of the three ways at differnet extent, as indicated by Table 4.

5. Perspectives

According to the results discussed above, a working model, called two-way elicitor/receptor molecular interaction model, for elicitation of tobacco resistance to brwon spot is now suggested in Figure 1. In this model, the continuous relaying from the primary elicitation to the secondary elicitation is contributed to the lasting expression of induced resistance. The primary elicitation may be accomplished either by the diffusible

elicitor, which can directly reach to the target sites of the plant and even reach to the target sequences (TS) of the third set (*set*-3) of plant genes (for concept see, Dong and Liu, Part 1), or by the contact recognition of the bound elicitor with the putative receptor on the host, which is only able to give a primary stimulation from which the putative secondary messenger will be transducted and activate the TS of the *set*-3 genes. When the *set*-3 genes ,here suggested to be PR genes, are activated by the stimulus originally from the primary elicitor, they will express to control expressions of the defence responses such as synthesis and accumulation of PRPs. The following events will be relaied by the secondary elicitation. The endogenous elicitor is produced by the enzymes of PRP to degrade cell walls of the plant or pathogen. Such an endogenous elicitor returns to act as stimulus directly or intermediately to the TS and continues the process of the resistance induction.

Evidently, this model is tried to explain how the elicitation of induced resistance perform scheduledly, which is concerned to both incompatible and induced resistances , but is not tried to include the mechanisms from the R-*avr* gene interaction of product recognition to the performations of different defence elements especially in terms of heterogenous or homogenous interactions and basic compatibility (Gabriel and Rolfe, 1990). The evidences, or at least indications,for the general suitability and pertinency of the model seems sufficient from the obtained results of researches on different elements in function of plant disease defence. Certainly, fulfilling the accurate steps involved in and understanding the perfomation of the model still remain to be demonstrated.

Table 4 Muti-resistance effects of different ways of induced resistance application[1]

Somaclone/ preparation	Increase(%) of resistance[2]		
	Wild fire	Black lowering	Black shank
NC89-TT	84.0	66.7	75.0
NC89-V1	80.0	37.5	33.3
NC89-V2	100	60.0	100
SRS2	-2.6	9.4	28.1

1) The values are calculated from ones in the related papers in Part 4 of this book.

2) The increase percentages are calculated in disease severity for SRS2 and in plant numbers with more than 20% increase of resistance for the 3 somaclones.

3) Effects of controlling TMV mosaic are not presented in this paper.

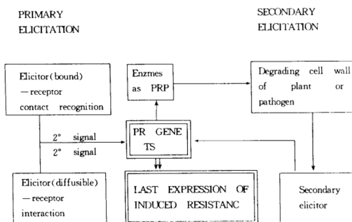


Fig. 1 The two-way elicitor-receptor interaction model

烟草赤星病菌致病力分化与弱毒株抗性诱导作用的研究

董汉松　王智发

近年来，烟草赤星病(*Alternaria alternata*)在我国各烟区严重发生，是影响烟草生产的重要病害之一(陈瑞泰等，1989)[1]。鉴于国外对烟草病毒病和霜霉病等的诱导抗性研究及防治取得一定进展，作者试图探讨利用诱导抗性防治赤星病的可能性，对我国赤星病菌致病力分化等作了研究分析。结果(1989年进行研究)报道如下。

一、材料与方法

致病力和诱导抗性测定所用的接种体有整体接种体和孢子接种体。整体接种体的制备方法是：将菌株放在PDA (pH5.5)平板上，24℃培养21天之后，加灭菌的1%葡萄糖溶液5—10ml浸15分钟，用接种铒刮下孢子和菌丝体配成悬浮液，孢子含量高到1.0×10^5/ml，菌丝体含量约0.5g湿重/ml。孢子接种体是将上述悬浮液用灭菌脱脂棉过滤去除菌丝体，所得孢子液离心(4000转/分，20分钟)沉降和用灭菌水洗3次，最后用1%葡萄糖溶液配成悬浮液，孢子含量调到1.0×10^5/ml。

致病力测定的方法是将整体接种体用悬滴法(董汉松等，1989)[2]接种在10株烟苗(9—10叶期)的第四、五真叶表面，同时取相同部位的25片叶作离体叶片接种。无论是幼苗还是离体叶均在叶表面接种12—15滴(每滴约24μl)，以灭菌的1%葡萄糖溶液接种作对照。接种的幼苗先保湿(保湿箱温度为24℃±)48小时，取出后在温室(24℃±)内放3天，检查发病情况。接种的离体叶放在瓷盘中，24℃±温箱内保湿3天，随即检查发病情况。

致病力强弱的定量方法是计测幼苗接种后的病叶率、叶片接种位点的发病率和发病严重度，以及计测离体叶接种后的发病率和严重度。严重度的划分标准是：0级，不发病；1级，50%的接种位点形成病斑，病斑间不联接；2级，全部接种位点产生病斑，病斑不联接；3级，全部接种位点产生病斑，少数病斑联接；4级，60%的叶面枯死；5级，60%以上叶面到全叶枯死。

各个菌株生长量和产孢量的测定方法(董汉松等 1989)[3]是将菌株在PDA (pH5.5)平板上培养(24℃±)7天，分别计测菌落面积(cm^2)、气生菌丝高度(mm)和产孢量(孢子/cm^2)。

诱导抗性的研究是按致病力测定的方法，用弱毒株和中毒株共11个菌株的孢子接种体预接种烟苗(9—10叶期)的第四、五真叶，保湿48小时后取出，在温室内放5天，再用强毒株TBA28和TBA19的孢子接种体在已预接种的幼苗第六、七真叶上作挑战接种，保湿2天和温室内放3天后，分别计测发病叶百分率和严重度。每一诱导-挑战处理各接种6株苗，用1%葡萄糖溶液接种作对照。

二、试验结果

1. 病菌致病力的分化

对20个菌株测定的结果(表1)表明,病菌不同菌株的致病力有明显的差别,其中,菌株TBA28和TBA19致病力最强,TBA24、TBA12、TBA17和TBA8等菌株致病力中等,其余菌株致病力较弱或微弱。

表1 烟草赤星病菌20个供试菌株的来源与致病力

Table 1 The geographical sources and pathogenicity of the tested strains

菌株	来源	发病率			严重度	
		幼苗叶片发病率(%)	幼苗叶位点发病率(%)	离体叶片发病率(%)	幼苗病叶平均病级	离体叶片平均病级
TBA28	山东昌乐	100	100	100	4.0	4.0
TBA19	云南玉溪	100	100	100	4.0	4.0
TBA24	山东平邑	100	17.8	100	3.5	1.5
TBA12	山东沂水	36.8	3.8	20.5	1.1	0.5
TBA17	山东临朐	13.6	1.6	10.2	0.1	0.2
TBA8	山东莒县	12.0	1.6	7.7	0.3	0.3
TBA15	云南玉溪	8.6	1.4	3.8	0.1	0.1
TBA9	福建龙岩	8.6	3.8	7.7	0.1	0.1
TBA33	山东昌乐	7.5	3.3	5.0	0.1	0.1
TBA6	山东泰安	6.6	1.6	1.9	0.3	0.1
TBA10	山东临朐	6.0	0.9	7.7	0.3	0.2
TBA22	山东平邑	5.8	0.9	10.3	0.1	0.2
TBA11	山东安丘	5.4	1.2	2.6	0.2	0.1
TBA16	山东临朐	5.0	0.9	1.0	0.1	0.1
TBA25	山东平邑	4.3	0.9	1.3	0.1	0.1
TBA34	山东昌乐	3.3	1.1	5.0	0.1	0.1
TBA14	山东沂水	2.0	1.4	1.3	0.1	0.1
TBA27	山东平邑	1.4	4.2	2.6	0.12	0.1
TBA20	山东青州	1.1	1.6	5.6	0.1	0.1
TBA32	山东昌乐	0.9	0.9	0	0	0
CK	—	0	0	0	0	0

赤星病菌的分化不仅表现在不同菌株的致病力差异方面,测定的20个菌株生长量和

产孢量也有不同。致病力强弱不同的10个菌株生长和产孢的情况(图1)表明，病菌的产孢量与菌落面积呈正相关，与气生菌丝生长量呈负相关趋势。强毒株具有菌落扩展慢、气生菌丝生长量高和产孢量低的特征，而弱毒株则相反。

2. 弱毒株诱导的抗病性

在致病力分化研究的基础上，选出10个弱毒株和1个中毒株对烟苗作诱导接种，然后用2个强毒株作挑战接种，发病情况见表2。在11个诱导菌株中，有9个菌株可以程度不同地减轻赤星病的发生，诱导后烟苗由挑战接种引起的病叶率和严重度下降10%以上。其中以菌株TBA16的作用最为明显，使发病率和严重度分别下降33.7—48.2%和1.5—2.5级，抗性诱导效应分别为50—61%和60—71.4%。可见诱导抗性的作用是明显的，而且是系统性的。

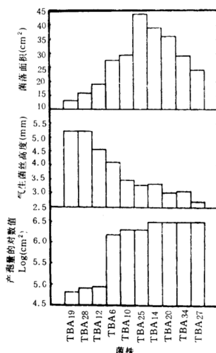


图1 烟草赤星病菌10个菌株在PDA培养基上的生长量和产孢量

Fig. 1 Growth and sporulation of the pathogen under artificial culture

表2 预接种赤星病菌弱毒株的烟苗经挑战接种后的发病情况

Table 2 Effects of the hypovirulent strains to induce tobacco resistance

预接种的弱毒株	菌株TBA28挑战接种*		菌株TBA19挑战接种*	
	病叶率(%)	严重度(病级)	病叶率(%)	严重度(病级)
TBA34	88.1(0)	3.5(0)	73.4(0)	2.5(0)
TBA32	80.0(0)	3.5(0)	66.7(0)	2.5(0)
TBA30	80.0(0)	2.0(42.9)	40.0(44.5)	1.5(40.0)
TBA9	80.0(0)	2.5(28.6)	60.0(10.0)	1.5(40.0)
TBA6	70.0(12.5)	2.0(42.9)	60.0(10.0)	2.0(25.0)
TBA10	64.0(20.0)	2.0(42.9)	53.3(20.1)	1.5(40.0)
TBA11	64.0(20.0)	2.0(42.9)	53.3(20.1)	1.5(40.0)
TBA14	64.0(20.0)	2.0(42.9)	53.3(20.1)	1.5(40.0)
TBA38	64.0(20.0)	2.0(42.9)	53.3(20.1)	1.5(25.0)
TBA25	56.0(30.0)	2.0(42.9)	23.4(65.1)	2.0(25.0)
TBA16	31.2(61.0)	1.0(71.4)	33.0(50.0)	1.0(60.0)
对照	80.0	3.5	66.7	2.5
系统误差**	±13.3(±16.6)	±0.5(±14.3)	±13.3(±19.9)	±0.5(±20.0)

* 括号内的数字为抗性诱导效应(%)，由各处理观察值与对照值的差值除以对照观察值而得。

** 为对照中离均差的最大值与最小值。

三、讨 论

研究病菌致病力分化及其生物学表现，可为筛选弱毒株用于诱导抗性研究提供依据。本研究表明弱毒株可有效地诱导烟草对赤星病的系统抗性，这在我国烟草上尚属首次报道。弱毒株产孢量大和孢子接种体易于定量的优点，为该项研究提供了方便。但并非所有弱毒株都有明显的抗性诱导效应，70％的抗性诱导效果也并不理想，霜霉菌（*Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*）弱毒株对烟草抗霜霉病的诱导效应可达 90％以上（Cohen 等，1981）[4]。因此，对更多的菌株进行筛选和测定是必要的。

参 考 文 献

[1] 陈瑞泰、王智发等，烟草赤星病，烟草病虫害防治，山东科学技术出版社，1989，10－17。

[2] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力测定方法的研究，山东农业大学学报，1989，**20**（4）：1－8。

[3] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌不同菌株在 11 种培养基上的生长和产孢能力，中国烟草，1989，**4**：1－9。

[4] Cohen, Y. and Kuc, J., Evaluation of systemic resistance to blue mold induced in tobacco leaves by prior inoculation with *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. Phytopathol., 1981, **71**: 783－787.

PATHOGENICITY DIFFERENTIATION OF *ALTERNARIA ALTERNATA* AND INDUCED RESISTANCE OF TOBACCO TO BROWN SPOT BY THE HYPOVIRULENT STRAINS

Dong Hansong and Wang Zhifa

The pathogenicity for 20 strains of *Alternaria alternata* collected from 10 places in China was tested. The evident differentiation of pathogenicity between different strains was indicated by both frequency and severity of brown spot of seedling and detached leaves after inoculation. The pathogenicity of strains was found to be related to their performance under cultured conditions. The strong virulent strains showed slow growth of colony, vigorous extension of aerobic hyphae and weak sporulation, while the weak virulence strains were inverse. Based on these properties, 11 weak virulence strains were selected for prior inoculation to tobacco seedling leaves, followed by challenge inoculation with 2 strong virulent strains. About 40－70％ systemic protection to tobacco seedlings against brown spot was induced by 9 strains, and of them the strain TAB16 showed highest inductory effect.

烟草抗赤星病的诱导因子谱：1. 根据培养性状筛选有效的弱毒株

董汉松　刘爱新　高明友　张成喜
初明光　陈建文　尹东升

植物诱导抗病性虽在诱导因子种类上是非专化性的，但某种植物对某种病害的诱导抗性常有不同的诱导因子种类，不同因子的诱导效果也不尽相同[1]。筛选有效的诱导因子是研究诱导抗性机制及利用途径的第一步，鉴于对烟草赤星病的有关研究以前在世界上还是空白，作者首先必须从建立诱导因子谱入手。这项工作自1988年开始，现已形成了一个专门研究组，并把诱导抗性在机制和利用途径两方面作了多种扩展研究。建立的诱导因子谱有4类：赤星菌弱毒株；病毒；非病原细菌；化学物质。本文是关于弱毒株筛选的研究结果，同时提供了一个可供继续研究用的菌株库(1988—1992年进行研究)。

从全国11个主产烟省29个烟区及希腊 Thenssaroniki 烟区烤烟、白肋烟、香料烟不同品种上采集了300多份病样，得到320个 *Alternaria* spp. 分离物，从中鉴定、纯化出209个赤星菌(*A. alternata*)菌株，用它们测定了培养性状、致病力分化及其与诱导烟草抗赤星病的能力之间的关系。这209个菌株对烟草致病力强、中、弱的比例分别为20%、23%、57%；致病力强的菌株在培养时，菌落生长能力、产孢能力差，致病力弱的菌株正好相反。选出致病力不同的19个菌株用作烟草抗赤星病的诱导因子，表明致病力弱的菌株可以明显的诱导烟草对赤星病的系统抗性，当诱导孢子含量为10^4—10^5/ml 时，抗性诱导效应为29—55%，其中以菌株 TBA16、TBA207 效应最强(55%以上)；而致病力强的菌株无抗性诱导作用或诱导感病性。这些结果说明，培养性状可以作为筛选有效的抗性诱导菌株的依据。

一、材料和方法

1. 病样采集和菌株分离、鉴定、保存

从全国11个主产烟省的29个烟区，希腊 Thenssaroniki 烟区采到病叶、病茎300多份，在 PDA 培养基上分离，得到320个分离物(*Alternaria* spp)；经纯化，鉴定为 *A. alternata*(Fr.)Keissler[2]的菌株有285个，挑除被其他真菌污染的菌株(未作单孢纯化)后剩下的209个菌株(表1)保存在本研究室(PDA 斜面，4℃±)。这209个菌株采集分离时间、寄主来源是：TBA151－TBA169，1990，白肋烟；TBA291－TBA310，1990，香料烟，品种 Basma；其余菌株，1986－1990，烤烟，品种 G140、红花大金元、Coker258、H-423、K326、K399、NC82、NC89等，具体菌株的具体品种来源见参考文献[3]。

2. 培养性状测定

在 PDA 平板上测定菌落生长、产孢能力，每平板点6个菌株的菌落块、作两皿，生长

和产孢能力分强、中、弱，具体方法依文献[4]。

3. 致病力测定

烤烟品种G140在花盆（12×12cm）中长到7—9叶期，用各个菌株的孢子（10^5±/ml）悬液悬滴接种第3、4真叶，每菌株接种4棵苗，诱发病害后计测病级，病级1以下记为致病力弱，病级2为中、3和4为强，具体方法和标准依参考文献[5]。

4. 抗性诱导效应测定

选出致病力强的菌株6个、中等的3个、弱的10个用作诱导菌株。先用诱导菌株的孢子（10^4—10^5/ml）悬液悬滴诱导G140幼苗（7—9叶期）的第3、4真叶，保湿后在16—25℃下生长[4]，第12天用菌株TBA28的孢子（10^5±/ml）悬液悬滴挑战第5、6真叶，诱发病害[5]后计测病斑直径。每个诱导菌株各诱导接种6棵烟苗，每叶接种6—8滴，以灭菌水同样处理另6棵苗为对照，抗性诱导效应表示为平均病斑直径减小的百分数。

二、结果与讨论

1. 病菌致病力分化与培养性状的关系

表1是赤星菌菌株资源一览表，可以直接看出两点：①不同菌株的致病力有明显差别，在209个菌株中，致病力强(S)、中等(I)、弱(W)的菌株各占20%、23%、57%；②致病力的强弱与产孢能力强弱正好是反相关关系，也与菌落生长能力呈反相关关系。这在菌株地理和烟类来源比较广泛的基础上，证实了作者以前的报道[4]。

病菌致病力的分化是在一定环境条件下寄主-病原物互作的结果：当环境条件不宜于病害流行，或连续栽培抗病品种时，病菌群体中、强致病力菌株发生的频率就高，把本文提示的菌株来源品种与作者最近报道的病菌致病力在地理上和品种中发生状况的研究[3]相比较，就会更清楚地了解这一点。这就从寄主-病原物群体互作水平上为筛选具有抗性诱导作用的弱毒株提供了依据。

2. 菌株抗赤星病诱导能力与致病力、生长产孢能力的关系

表2的结果说明了一种趋势：赤星病强致病力菌株没有诱导烟草抗赤星病的能力，其中TBA43和TBA28可以明显地诱导感病性；而弱毒株则显示29—55%的抗性诱导效应，其中以菌株TBA16和TBA207效果最好；致病力中等的菌株抗性诱导效应不明显，只有4—26%。根据这种趋势，以及致病力与生长、产孢能力间的反相关关系，可以把在培养基上生长好、产孢能力强的菌株直接选作抗性诱导因子。

3. 关于赤星菌菌株库的意义

表1列出菌株库的目的是想在两方面提供研究启发和准备。第一，对诱导抗性利用途径的研究意义有二：①可以从中筛选比TBA16、TBA207抗性诱导效应更高的菌株；②已明确病菌致病力是稳定的[6]，对弱毒株抗性诱导作用的直接利用不仅在操作上简便易行，也排除了病菌致病力变强的潜在危险。第二，可以作为带动有关机制研究的立足点。弱毒

表 1　烟草赤星病菌菌株来源、产孢能力和致病情况一览表

Table 1　Schedule of *Alternaria alternata* strains from tobaccos

地理来源	菌株[1)]	产孢力[2)]	致病力[2)]	地理来源	菌株[1)]	产孢力[2)]	致病力[2)]
福建					TBA164	W	S
龙岩	TBA1	S	W	龙黑	TBA166	W	S
	TBA 9	S	W		TBA169②	W	S
	TBA37	S	W		TBA171	S	W
永定	TBA38	I	W		TBA172	S	W
	TBA41	S	W		TBA174	S	W
	TBA42	S	W		TBA175	I	I
	TBA43	W	S	福州	TBA192	I	I
	TBA45	S	I		TBA200	S	W
	TBA47	S	W	铜江	TBA201	S	I
					TBA202	I	I
云南	TBA15	S	W		TBA203	S	W
玉溪	TBA19	S	I		TBA204	S	W
	TBA336	S	W		TBA205	I	S
楚雄	TBA337	S	W		TBA206	S	W
	TBA338	I	I		TBA207	I	W
	TBA339	S	W		TBA208	I	S
	TBA340	I	I		TBA209	I	I
					TBA210	W	S
贵州	TBA119	S	W		TBA211	W	S
福泉	TBA120	I	W		TBA212	W	S
	TBA121	W	W		TBA213	W	S
	TBA122	I	I		TBA214	I	I
	TBA123	W	S		TBA215	W	S
	TBA124	I	I	遵义	TBA224	S	W
	TBA125	S	W		TBA225	S	W
	TBA126	I	I		TBA226	I	I
	TBA129	S	I		TBA227	S	W
	TBA131	I	I		TBA228	I	I
	TBA133	S	W		TBA229	I	W
	TBA134	S	W		TBA230	I	I
	TBA135	I	I		TBA246	S	W
	TBA136	S	W		TBA247	S	W
	TBA137	S	W		TBA248	S	W
	TBA138	S	W		TBA249	S	W
	TBA139	S	W		TBA250	S	W
	TBA140	I	I	册亨	TBA251	I	W
	TBA141	S	I		TBA252	W	S
	TBA142	S	W		TBA253	W	S
	TBA144	S	W		TBA254	W	S
	TBA145	I	I		TBA255	I	S
	TBA147	S	I	贞丰	TBA256	W	S
	TBA148	I	I	兴义	TBA283	I	I
	TBA149	S	W		TBA284	I	I
	TBA150	W	S		TBA286	S	W
	TBA151②	W	S		TBA287	S	W
	TBA152	S	W	四川			
	TBA154	W	S	什邡	TBA183	I	I
	TBA155	S	W		TBA185	W	S
	TBA156	S	W	湖北			
	TBA157	W	S	襄凡	TBA231	S	W
	TBA158	I	I		TBA232	I	I
	TBA160	S	W		TBA233	I	I
	TBA161	S	W		TBA234	S	W
	TBA162	I	I		TBA235	S	W
	TBA163	I	I		TBA236	S	I

续表 1

地理来源	菌株[1]	产孢力[2]	致病力[2]	地理来源	菌株[1]	产孢力[2]	致病力[2]
	TBA237	S	W	莒县	TBA8	I	S
	TBA239	S	W	青州	TBA20	S	W
	TBA240	S	W	平邑	TBA5	S	W
	TBA242	S	W		TBA21	S	W
	TBA243	S	W		TBA22	S	I
	TBA244	S	W		TBA23	S	W
	TBA245	S	W		TBA24	I	W
江苏					TBA25	S	W
新沂	TBA311	S	W		TBA26	S	W
	TBA312	S	W		TBA27	S	W
	TBA313	S	W	泰安	TBA6	W	S
	TBA314	S	W		TBA7	S	W
	TBA315	S	W	临朐	TBA10	W	S
安徽					TBA16	I	W
凤阳	TBA2	S	W		TBA17	S	W
	TBA66	S	W		TBA18	S	W
	TBA67	S	I	沂水	TBA12	S	W
	TBA89	S	I		TBA14	I	I
亳州	TBA95	S	W	昌乐	TBA28	W	S
	TBA96	S	W		TBA29	S	W
	TBA97	S	W		TBA30	S	W
	TBA98	W	S		TBA31	I	I
	TBA100	S	W		TBA32	S	W
	TBA101	S	W		TBA33	S	W
	TBA102	W	I		TBA34	I	W
	TBA103	I	I	吉林			
	TBA104	S	W	和龙	TBA261	I	I
	TBA105	S	W	龙井	TBA271	S	W
	TBA106	W	S		TBA272	W	S
	TBA107	S	W		TBA273	S	W
	TBA109	S	W		TBA274	I	I
	TBA110	I	I		TBA276	I	I
	TBA111	S	W		TBA277	S	W
	TBA112	S	W		TBA278	I	I
	TBA113	S	W		TBA280	S	W
	TBA114	S	W	希腊			
	TBA116	I	W	萨市	TBA291[2]	W	S
	TBA117	I	I		TBA292	W	S
	TBA118	W	S		TBA293	S	W
河南					TBA294	S	W
登封	TBA316	S	W		TBA295	W	W
	TBA317	S	W		TBA296	S	W
	TBA319	S	W		TBA297	S	W
	TBA320	S	W		TBA299	S	W
洛阳	TBA321	S	W		TBA300	W	S
	TBA322	S	W		TBA301	I	I
	TBA323	W	S		TBA303	S	W
	TBA324	I	S		TBA304	S	W
	TBA325	S	W		TBA305	S	W
山东					TBA306	S	W
安丘	TBA4	I	I		TBA307	W	S
	TBA11	S	W		TBA308	W	S
	TBA13	S	W		TBA309	W	S
诸城	TBA3	S	W		TBA310[2]	W	S

1)菌株 TBA151－TBA169 来自白肋烟，TBA291－TBA310 来自香料烟，其余均来自烤烟。

2)产孢能力和致病力分为：S＝强，I＝中，W＝弱

表 2　赤星病不同致病力菌株诱导烟草抗赤星病的情况

Table 2　Effects of *Alernaria alternata* strains to induce tobacco resistance to brown spot

诱导菌株		挑战接种后病斑直径(mm)	诱导效应(病斑直径减小,%)
编　号	致病力		
TBA28	S	15.7	−49.5
TBA43	S	14.7	−40.0
CK		10.5	
TBA16	W	7.8	55.4
TBA17	W	11.1	36.6
TBA152	W	11.9	32.0
TBA155	W	12.4	29.1
TBA156	W	12.4	29.1
TBA201	I	12.8	26.9
TBA203	I	14.8	15.4
TBA204	W	9.5	45.7
TBA205	S	17.6	−0.6
TBA206	W	11.9	32.0
TBA207	W	8.0	54.3
TBA208	S	14.8	15.4
TBA291	S	15.0	14.3
TBA295	W	10.1	42.3
TBA298	I	16.8	4.0
TBA300	S	18.0	−2.9
TBA303	W	8.9	49.1
CK		17.5	

株并不是在所有性状上都失去强毒株所具有的能力,关键的差别是产毒素能力和孢子侵染致病力降低或丧失[7],但保留了与寄主表面发生相互作用的能力,即可以与烟叶表面联结并通过对叶片的穿透生长(但不引起病斑扩展)诱导烟草对赤星病的系统抗性[8]。已在田间试验中获得防病效果的弱毒株制剂(PCF1 和 SRS)的制备基于以下假设:弱毒株孢子壁上含有能刺激烟草抗病性的物质——抗性诱导激发子(elicitor)(对它的研究作者将另文报道),这将引伸出关于寄主-病原物接触识别[9]与抗性诱导关系的系统研究,有关情况在文献[10]中已有叙述。

附:参加本项工作的其他同志

采集病样的有:陈锦云(福建龙岩地区农科所)、钱玉梅(安徽农科院烟草研究所)、李甲林(安徽省烟草公司)、关国经(贵州省农科院烟草研究所)、李永顺(贵州农学院)、孙光军(贵州省玉屏县烟草公司)、顾晓光(贵州省遵义市烟草分公司)、姚革(四川省农科院)、莘玲、陶金同(湖北省襄樊市烟草分公司)、崔永汉(吉林省延边地区农业科学研究所)、耿

继国（南京农业大学）、刘骏（河南农业大学）、李庆平（云南省楚雄市烟草研究所）等。

参加室内部分测定的有：侯成晓（山东农业大学植保系1991级学生）、杨献营（山东省烟草公司）、刘峰、王智发、郑继法（山东农业大学）。

一并表示衷心感谢！

参 考 文 献

[1] 董汉松，植物抗性生理研究（赵可夫主编），济南：山东科学技术出版社，1992，193－201。

[2] Simmons，E. G. et al.，Mycologia，1967，**59**：67－92

[3] 董汉松等，山东科学，1993，**6**(2)：25－32。

[4] 董汉松等，植物保护学报，1992，**19**：87－90。

[5] 董汉松等，山东农业大学学报，1989，**20**(4)：1－8。

[6] 董汉松等，山东科学，1993，**6**(2)：20－24。

[7] 王智发等，中国烟草学会第二次会员代表大会会刊，北京：中国烟草学会，1992，65－73。

[8] 董汉松等，植物保护学报，1993，**20**：129－134。

[9] 董汉松，农业生物技术进展与展望——国家863计划生物技术领域第一主题学术研讨会论文选编'92（贾士荣主编），合肥：中国科学技术大学出版社，1993，65－79。

[10] 董汉松等，山东科学，1993，**6**(2)：1－9。

INDUCERS OF TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT：1. SELECTING *ALTERNARIA ALTERNATA* HYPOVIRULENT STRAINS AS INDUCER BASED ON THEIR CULTURE PROPERTIES

Dong Hansong，Liu Aixin，Gao Mingyou，Zhang Chengxi，Chu Mingguang，Chen Jianwen and Yin Dongsheng

Relationships were studied of cultural properties and pathogenicity of *Alternaria alternata* with its capability of inducing tobacco resistance to brown spot. The tested 209 strains of the pathogen were originally selected from 320 isolates of *Alternaria* spp.，obtained from 320 samples of the diseased plants which included flue-cured，burley，and oriental tobaccos planted in 29 regions of 11 provinces of China and Thenssaroniki of Greece. The 209 strains showed significant differentiation in virulence to tobacco and composed of 3 types，20% strong-，23% moderate-，and 57% hypo-virulent strains. When 19 strains，including 6 strong virulence strains，3 moderate virulence strains and 10 hypovirulent ones，were used as inducers，29—55% induced resistance were given by the hypovirulent strains，with the best effect by strains TBA16 from Shandong and TBA207 from Thenssaronoki，while no by the strong virulence strains. The hypoviru-

lent strains gave vigorous growth and sporulation, in contrary with the strong virulent ones ,when cultured on medium plate. It was suggested that the cultural properties are able to be a convenient indicator for selecting strains as inducer of tobacco resistance to brown spot.

烟草抗赤星病的诱导因子谱：2. 化学物质

董汉松　刘爱新　杨献营　张留义
陈建文　侯跃亮　周　昕

非生长调节剂类的化学物质是植物诱导抗性研究中较早使用的一类诱导因子，它们具有以分子状态刺激植物的优势[1]。因此，在研究目的上化学物质用作诱导因子就有两个好处。①以分子状态刺激植物最有可能使抗性诱导在分子或基因层次上表现出来，PRP(病程相关蛋白)最早是用化学因子诱导发现的[2]，尤其是显示病毒特异性抑制作用的一种PRP也恰是化学物质诱导的[3]。这无论对了解诱导抗性的分子生物学和分子遗传学机制，还是对借助分子遗传学手段利用诱导抗性控制植物病害[2]，都是很有益处的。②化学因子在诱导的抗病性非常明显、对植物其他性状无不良影响、抗病性具较长持久期的情况下，直接应用就可成为有效、简便的途径。本文报道对烟草赤星病的有关研究结果(1991年进行研究)。

一、材料和方法

1. 材料

(1)烟草品种：用烤烟品种NC89，种子由本研究室繁殖、保存。

(2)菌株：挑战接种用赤星菌(*Alternaria alternata*)菌株TBA28，保存、繁殖、孢子悬浮液制备方法同前[4]。

(3)化学物质：用作诱导因子的化学物质有9种(表1，表2)，均以去离子水按设计浓度配制、稀释，需要时pH调到7.0。

2. 诱导抗性测定方法

NC89烟苗长到6－7叶期时用各化学物质按设计浓度喷洒(3WDS手持压缩喷雾器)第4真叶以下叶片；按设计时间用赤星菌TBA28孢子悬浮液(10^5±孢子/ml)悬滴接种第6－9真叶，每叶4－6滴；诱发赤星病[4]后计测病斑直径，抗性诱导效应表示为病斑面积减小的百分数。每项测定的不同化学物质、不同浓度各诱导6株烟苗，以另6棵烟苗喷洒去离子水并同样挑战接种为对照，统计结果取平均值。

3. 烟草生长情况的测定

在用不同浓度的ID1喷洒诱导烟苗的当天和第25天计测株高、叶片数、最大叶叶面积。

二、结果与讨论

1. 化学因子的抗性诱导作用及其特点

从表 1 看出，4 种化学物质可程度不等地诱导烟草对赤星病的抗性，其中 ID1 的效果可达 98%。它们都是被喷洒在烟苗的下部叶上，抗性诱导作用在上部叶得到表现，诱导抗性是系统性的，这是化学因子对烟草抗赤星病诱导的一个重要特点[5]。

表 1 4 种化学物质对烟草抗赤星病诱导的情况

Table 1 Effects of chemicals to induce tobacco resistance to brown spot

化学物质1)	挑战后病斑面积(mm^2)2)	病斑面积降低(%)
ID1	0.50	98.02
CK	25.25	
L-苯丙氨酸(L-Phenylalanine)	24.60	27.22
CK	33.80	
草酸(Oxalic acid)	14.10	14.55
CK	16.50	
磺基水杨酸(Sulfosalicylic acid)	20.58	14.48
CK	24.44	

1) 使用浓度为 0.1%(w/v)。2) 诱导后第 10 天挑战接种。

第二个特点是浓度效应(表 2)。SA 在这方面表现比较明显；它被选择作此项测定是因为前人已成功地用它诱导作物抗病性并在田间使用[6]，但表 2 表明它只有在较高浓度时才能明显诱导烟草对赤星病的抗性。ID1 不同浓度的作用比较稳定，当浓度降低 20—80 倍后，抗性诱导效应并无很大减弱；此物质已被用来与赤星菌弱毒株 TBA16 相结合而制成“赤星病诱导免疫制剂 SRS”，并用于田间控制赤星病的试验(作者另有报道，参见文献[7])。

表 2 ID1 和磺基水杨酸(SA)在不同浓度下的抗性诱导效果1)

Table 2 Resistance inductory effects of ID1 and sulfosalicylic acid (SA) at different concentrations

物质	浓度(%,w/v)	病斑面积(mm^2)	病斑面积降低(%)
ID1	1.0000	8.00	85.90
	0.1000	8.00	85.90
	0.0500	18.09	78.72
	0.02500	12.54	81.30
	0.0125		
CK	CK	56.70	
SA	1.0000	5.55	77.29
	0.1000	20.90	14.48
	0.0500	26.95	−10.27
	0.0250	22.89	6.71
CK	CK		

1) 第 10 天挑战。

第三个特点是时间效应，亦即诱导抗性的 3 个时间参数[1]：诱导期（迟滞期），最多 5 天；最大期，10 天；持久期，至少 40 天（表 3）。但抗性诱导效应差别并不明显，在 20—40 天内都保持较高的水平，这对直接应用是很有利的，也是 ID1 进入应用试验的依据之一。

表 3 ID1[1]抗性诱导效应的时间变化

Table 3 Resistance inductory of ID1 as related to the duration between induction and challenge treatments

挑战时间[2]	病斑面积(mm^2)	病斑面积降低(%)
5	18.0	68.75
10	8.0	86.11
20	12.5	78.29
30	18.3	68.23
40	16.7	71.01
CK	57.6	

1) 使用浓度为 0.1%(w/v)。2) 诱导处理后天数。

2. ID1 对烟草生长的影响

表 4 测定的是烟草幼苗期主要生长性状。ID1 在 4 个浓度上均可增加叶片数，说明能够促进烟苗长出新叶；浓度 0.0125%时，还可增加株高和叶面积。这种作用对烟草早期生长、叶片扩展有很大的实际意义，有利于烟叶早开片、及时积累各种物质，从而有利于合理成熟并促进烘烤期的物质合理转化[8]。这是 ID1 进入田间试验的又一个原因。

表 4 ID1 对烟草生长的影响

Table 4 Effects of ID1 on tobacco growth

浓度	株 高(cm)		叶 片 数		株 高(cm)	
(%,w/v)	当 天	第 25 天	当 天	第 25 天	当 天	第 25 天
0.1000	5.3	13.0	4.5	10.0	159	162
0.0500	5.5	10.5	4.5	9.0	180	162
0.0250	5.5	12.5	4.5	9.0	110	163
0.0125	7.3	16.0	5.0	9.0	140	201
CK	5.3	14.0	4.8	8.3	140	195

3. 化学因子诱导的感病性

马来酰肼等 5 种化学物质强烈地诱导烟草对赤星病的系统感病性，使发病加重 64% 到 3—4 倍以上（表 5）。这些物质在前人的研究中有效地被用作抗性诱导因子，如马来酰肼（是一种植物生长抑制剂）可以干扰植物-病原物互作而用于田间防病[6]。马来酰肼还曾被用作烟草抑芽剂；如果它能诱导抗病性，就可以发挥抑芽和治病双重作用。

表 5　化学因子诱导烟草感赤星病的情况

Table 5　Susceptibility of tobacco to brown spot induced by chemicals

化学物质[1]	病斑面积(mm^2)[2]	病斑面积增大(%)
马来酰肼(Maleic hydrazide)	113.04	300
CK	28.26	
柠檬酸(Citric acid)	60.44	282.30
水杨酸钠(Sodium salicylate)	61.65	289.90
甘氨酸(Gycine)	25.86	63.57
烟酸(Nicotinic acid)	82.25	420.24
CK	15.81	

1) 所用浓度为 0.1%(W/V)。2) 诱导后第 10 天挑战。

感病性也和抗病性一样,可以由不同的生物和非生物因子诱导发生[9,10],感病诱导因子的作用除了病原物-植物营养关系、直接对植物结构防御机制的削弱[11]外,更重要的是象抗性诱导因子一样对植物基因控制发生影响:"潜在的抗病基因"和"激活"[1,9]表达为诱导抗性;"潜在"的感病基因的"激活"表达为诱导感病性。这与分子遗传(DNA 序列)概念中的"基因对基因"关系所揭示的两类互作(病原物的无毒基因与植物的抗病基因间的互作导致植物抗病;毒性基因与感病基因间的互作导致植物抗病)[12,13]趋同,使人们能够通过植物被诱导后的产物(尤其是蛋白质)的变化反推抗病性的基因控制[1-3]。对烟草赤星病,抗性诱导已被证明与 PRP 的诱导有关,至少有两种 PRP 经烟草组织培养植株再生后可经种子在二代植株中增强合成。而在诱导感病性关系中,类似 PRP 的产物或者新产生或增强合成,这是一种"潜在感病基因"的生化表达,或者这类产物消失或合成减弱,这是通过对"潜在抗病基因"的抑制或"阻遏"实现的。本文列出的 4 种抗性诱导物质和 5 种感病诱导物质是从所测 14 种物质挑选出来的;有这样强烈的感病性诱导效应的物质对上述探讨是不可多得的材料,接下来的研究从诱导抗性和诱导感病性的分子生物学着手,作者将陆续报道研究结果。

参　考　文　献

[1] 董汉松,植物抗性生理研究(赵可夫主编),济南:山东科学技术出版社,1992,193—201。

[2] Rao,N.,Kuc,J.,The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals (Cole, G. T., Hoch, H. C. ed.). New York, London: Plenum Press, 1992,347—362

[3] 杜良成等,植物生理学通讯,1990,(4):1—6。

[4] 董汉松等,山东农业大学学报,1989,**20**(4):1—8。

[5] 董汉松等,山东科学,1993,**6**(2):47—52。

[6] Daly,J., Annu. Rev. Phytopathol.,1984,**24**:273—307。

[7] 董汉松、于建立,植物保护学报,1993,**20**:129—134。

[8] 张永耀等,津巴布韦烤烟生产技术,上海:上海科学技术出版社,1992,191—198。

[9] Kuc,J.,CORESTA Inf. Bull. 8th Tob. Sci. Cong.,1990,25—40.

[10] 董汉松等,山东科学,1993,**6**(2):33—39。

[11] Verma, D. P. S.,Molecular Signals in Plant-Microbe Communications. Boca Roton, Ann Arbor, London: CRC

Press, 1992, 65-84.
[12] 王金生,植物病理学报,1992,**22**:289—292。
[13] Gabriel,D. W. ,Rolfe, B. G. ,Annu. Rev. Phytopathol. 1990,**28**:365—391.

INDUCERS OF TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT:2. CHEMICALS

Dong Hansong, Liu Aixin, Yang Xianying, Zhang Liuyi, Chen Jianwen, Hou Yaoliang and Zhou Xin

Nine chemicals were tested for function of inducing tobacco resistance to brown spot. When the concentration of the chemicals was 0. 1%, 14—98% inductory effects were given by 4 chemicals ,indicated by decrease of size of 'brown spot' caused by challenge inoculation with the strong virulence strain TBA28 of *Alternaria alternata*, and the highest effect was shown by the chemical inducer ID1 and lowest by sulfosalicylic acid (SA). The induced resistance followed 3 characteristics: (a)it was systemic and able to transduct from the down to up parts of the plants, (b)it occurred at a concentration effect, for ID1, both 1% and 0. 1%inducing conc acquired the same desirable effect (86%), the conc from 0. 05% to 0. 125% expressed slight reduction of the inductory effects (78—81%); while for SA, only over 0. 1% conc was capable of inducing the resistance, and(c) it expressed in a time sequence, beginning at the 5th day, peaking at 10th day, and lasting at least 40 days after induction treatment, respectively with inductory effects of 69%, 86%, and 68—78%. The ID1 was also beneficial to tobacco growth, especially stimulated extending of plant height and leaf size. These properties of ID1 had led to the application experiments for the disease control. Of the 9 chemicals, 5 ones induced strong systemic susceptibility of tobacco to the disease. The disease severity was enhanced at 0. 6—4. 2 times ,with the biggest effect of susceptibility induction by nicotinic acid. It is suggested that the strong effects of susceptibility induction can become an insight, with the same significance as "induced resistance"phenomena, for exploring the mechanisms of molecular and genetic control of induced resistance.

烟草抗赤星病的诱导因子谱：
3. 非病原细菌的作用及田间应用效果

董汉松　刘爱新　张成喜　高明友　朱广振
林永柱　孙晓平　杨献营　张修国　刘广亮　田福海

用拮抗性细菌、细菌素产生菌（生防菌）防治植物真菌、细菌病害的研究有大量报道[1-3]，原理和实际收效取决于生防菌抗病原物物质的性质和生物活性及活性在植物病理生态中发挥的效果；属于主要用微生物代谢产物进行生物防治的一种途径，植物的抗病性并不能得到诱发和加强。从诱导植物抗病性的途径对非病原细菌加以利用，最可能引向实用技术的是这种诱导抗性以菌剂的形式直接应用，而更重要的是从细菌作为诱导因子诱发植物抗病性的机制层次上寻求诱导抗性利用的其他途径[4]。本文是这方面的研究结果（1990－1992 年）。

一、材料和方法

1. 材料

（1）烟草：室内测定用的烤烟品种是 NC89。田间试验用当地栽培品种：临朐，NC89；昌乐、沂水、莒县，NC82；沂南，K326。

（2）赤星菌：室内作挑战接种用的赤星菌（*Alternaria alternata*）菌株是 TBA28[4]。

（3）细菌菌株：用于抗性诱导作用筛选的非病原细菌菌株共 52 个，是从 100 多个分离物先经皿内抑菌试验排除对赤星菌的拮抗作用选出的。这 52 个菌株分 3 类：①从烟草生态分离的 25 个，包括来自根际土的 TBS 系列 25 个（属 *Bacillus* sp.）、叶面的 AL 系列（*Bacillus* sp.）6 个及 PS-1、PS-2（*Pseudomonas fluorescens*）；②从黄瓜叶面分到的 BA 系列菌株（*Bacillus* sp.）7 个和 MN1、MN2（未知种类）；③从番茄叶面分到的 C 系列菌株 9 个和 P1（均为 *P. fluorescens*）。

2. 温室内试验

（1）排除细菌拮抗作用的方法：赤星菌菌株 TBA28 在 PDA 培养基上生长 7－10 天（25℃±）后，在菌落四周离菌落 0.5cm 处点接细菌分离物，每个培养皿对称点 10 个分离物，在 25℃±下培养 3 天，无抑菌圈的留作抗性诱导筛选。

（2）抗性诱导作用筛选方法：用叶部注射（渗入 filtration）和茎部注射法[6]，菌悬液含菌量调到 10^4-10^5cfu/ml，第 10 天挑战接种。诱发病害[5]后检查病斑直径，抗性诱导效应用病斑直径减小的百分数表示。

（3）菌株 P1 诱导抗病性的条件：主要测定 3 组条件。①剂量效应：P1 在肉汁胨平板上长 3 天（25℃±），用灭菌水洗下并作 10 倍稀释，按叶面喷洒法诱导，第 10 天挑战；②诱

导方法：5 种，均按[6]，诱导接种菌量为 10^4-10^5cfu/ml；第 10 天挑战；③挑战接种时间：分诱导后第 10、25、40 天挑战接种，按分次诱导、一次挑战的方法进行，诱导方法是叶面喷洒、菌液含菌 10^4-10^5cfu/ml。各诱导 6—8 株烟苗(7—9 叶期)的第 4、5 真叶、挑战第 7、8 真叶，以灭菌水同样诱导处理为对照。

3. 田间试验

(1) 试验田：1992 年在山东临朐、昌乐、沂水、莒县、沂南 5 县选点，前 3 县各 2 亩，后两县各 13 亩，按处理平分并随机排列处理区。

(2) 用药处理：分 3 区。①对照：不施药。②菌核净：按每亩 140g 兑水 150kg 的量喷雾。③P1 制剂：P1 被选为田间试验菌株的根据有三，一是它属 *P. fluorescens*，菌悬液易于制备，二是它在抗性诱导作用中效果较好，三是它对烟草叶面的适应性较强。P1 水悬剂中含浮载剂(羟甲基纤维素 0.1%，w/v)菌体 $10^{10}-10^{11}$cfu/ml，按每亩地 500ml 兑水 150kg 的量喷雾。喷雾时间根据试验点情况，在烟草下部叶始见病斑时作第一次喷药，以后各间隔 13—15 天再喷两次。

(3) 病情计测：于每次用药后 10—15 天内调查病情，病级标准和病情指数计算同[8]。

(4) 农艺性状：计测烟株平顶时的株高，下、中、上部成熟叶最大叶面积，各查 50 株，取平均植；亩产量是每次烤后销售量相加的实际值。

(5) 销售品质性状：上中等烟叶比例、均价、产值是每次出售记录然后统计的实际值。

(6) 烟叶内在品质：取等级为上桔二的烟叶(每处理 1kg)委托中国农业科学院烟草研究所中心分析室(国家指定的合法分析单位)检验。

二、结　果

1. 温室内测定

(1)非病原细菌抗性诱导作用的总体情况：表 1、表 2 是来自烟草和另两种植物环境的菌株对烟草抗赤星病的诱导情况。有两点可以明确：①非病原细菌可以诱导烟草对赤星病的系统抗性。在测定的 52 个菌株中，有 31 个(60%)显示 20%以上的抗性诱导效应；但只有 5 个菌株效应为 40%以上、2 个菌株(TBS5、TBS6)高于 60%；13 个菌株作用不明显(效应小于 10%)，11 个菌株诱导感病性；②抗性诱导效应与菌株来源(植物、环境)没有直接关系。另外，对抗性诱导效应较强的来自烟草根际土的 TBS5、TBS6 和来自番茄叶面的 P1 在烟草叶面上的适应性作了测定，10 天后 TBS5 和 TBS6 菌量从 10^6cfu/cm² 减小到 10^2cfu/cm² 以下，而 P1 保持在 10^4-10^5cfu/cm²。

(2)菌株 P1 抗性诱导作用的条件：表 3 是与下一步田间试验有关的 3 组条件：诱导接种菌量低于 10^5cfu/ml 时效应很低；在 5 种诱导方法中灌根效果最好；抗性诱导效应随挑战接种时间的延长而减弱，但到第 40 天仍能表现出来。

表 1 来自烟草生态的非病原细菌对烟草抗赤星病的诱导作用

Table 1 Ability of nonpathogenic bacteria from tobacco ecology to induce the resistance

细菌菌株	病斑直径减小(%)		细菌菌株	病斑直径减小(%)	
	叶片注射	茎部注射		叶 注	茎 注
TBS1	19.4	23.6	TBS18	5.9	20.7
TBS2	13.5	26.8	TBS19	−14.1	6.2
TBS3	25.8	39.5	TBS20	−1.5	−1.4
TBS4	16.1	20.4	TBS21	6.7	4.8
TBS5	34.8	62.7	TBS22	3.7	22.8
TBS6	32.9	60.5	TBS23	3.0	2.8
TBS7	−5.8	5.7	TBS24	14.1	32.4
TBS8	29.9	21.0	TBS25	5.2	2.1
TBS9	20.0	23.6			
TBS10	1.9	14.0	AL-1	4.0	13.7
TBS11	−14.8	−0.6	AL-3	−8.5	4.4
TBS12	0.6	10.2	AL-4	8.5	11.5
TBS13	7.4	4.8	AL-5	−1.8	1.8
TBS14	3.0	−4.8	AL-6	5.4	6.6
TBS15	0.7	11.0	AL-7	−0.9	8.4
TBS16	9.6	29.7	PS-1	13.4	9.3
TBS17	−0.7	−2.8	PS-2	7.6	−2.6

表 2 来自番茄和黄瓜叶面的非病原细菌对烟草抗赤星病的诱导作用

Tabele 2 Ability of nonpathogenic bacteria from leaf surfaces of tomato and cucumber to induce tobacco resistance to brown spot

细菌菌株	病斑直径减小(%)		细菌菌株	病斑直径减小(%)	
	叶片注射	茎部注射		叶 注	茎 注
C1	31.1		MN1	5.6	1.9
C2	40.5	10.2	MN2	2.1	18.6
P1	16.3	49.7	BA1	−5.6	6.2
C9	21.1		BA2	13.3	11.2
C11	14.4	37.7	BA3	4.9	4.3
C13	35.7	41.1	BA4	−3.5	−62
C22	5.6	34.8	BA5	−7.7	−0.6
C23	−12.6	8.7	BA6	27.3	23.0
C94	26.6	9.3	BA7	−1.4	18.6
C95	17.5	16.8			

表 3 诱导接种菌量等条件对菌株 P1 抗性诱导效应的影响

Table 3 Effect of resistance induction (RI)of bacteria P1 as related to dosage and method of induction treatment

接种菌量的影响		诱导方法的影响		挑战接种时间的影响	
菌量(cfu/ml)	诱导效应(%)	诱导方法	效 应(%)	诱导接种后天数	诱导效应(%)
10^9	94.2	叶片注射	31.0	10	44.9
10^7	94.4	茎部注射	22.8	25	29.0
10^5	79.1	喷洒	27.7	40	22.4
10^3	11.1	灌根	46.2	菌量 10^{4-5}cfu/ml;	
10^1	−12.7	伤口	24.7	喷洒	
喷洒诱导	第 10 天挑战				
		菌量 10^{4-5}cfu/ml,			
		第 10 天挑战。			

2. 田间试验

(1) P1 控制赤星病的效果:田间试验中以菌核净(目前防治赤星病应用最广、效果最好的化学农药)为对比,表 4 是结果:P1 有一定的防病效果,在烟草生长前期好于后期;但总的看不如菌核净。

表 4 用细菌菌株 P1 在田间防治赤星病的效果

Tabel 4 Control of tobacco brown spot with bacteria P1 in the fields of Shandong Province

试验地点	月·日		病情指数			病情指数降低(%)	
	喷 药	调 查	CK	P1	Dimethachlon[1]	P1	Dimethachlon[1]
临朐	7.27	8.7	18.9	9.5	14.0	49.7	25.9
	8.10	8.20	38.9	30.0	18.5	22.1	52.4
	8.25	9.7	57.6	43.9	33.9	23.8	41.2
昌乐	8.1	8.10	16.4	10.5	12.8	36.0	22.0
	8.20	8.29	23.3	20.0	21.3	13.7	8.2
沂水	8.6	8.23	24.9	16.0	20.6	35.8	17.3
沂南	8.7	8.23	6.6	5.1	4.9	22.3	25.8
莒县	8.1	8.13	34.4	20.6	15.6	40.0	54.5
	8.14	8.25	28.1	27.1	16.8	3.5	40.2
	8.27	9.3	40.9	32.3	1.9	21.1	95.4

1) Dimethachlon:菌核净,即纹枯利。

(2) P1 对烟叶内在品质的影响:表 5 是用于分析烤烟烟叶内在品质的常规化验项目,结果表明 P1 对改善烟叶品质作用非常优异:形成烟气的化学物质含量合理;K 含量高、Cl 含量低,K/Cl 比值高(影响卷烟的燃烧性,常规在 1.0 以上为好)。在这些性状上,

菌核净带来明显的不良影响。

表5 不同处理区上桔二烟叶化学成分

Table 5 Chemical components of cured leaves from different treatment in field control of tobacco brown spot

分析项目	烟叶来源		
	CK 区	P1 区	菌核净区
还原糖(%)	14.17	17.11	11.04
总糖(%)	19.00	21.11	12.66
尼古丁(%)	3.08	2.77	3.89
蛋白质(%)	10.08	10.01	10.08
总氮(%)	2.15	2.08	2.28
总糖/蛋白质(施木克值)	1.89	2.43	1.26
K_2O(%)	0.51	1.12	0.67
Cl(%)	0.85	0.76	0.83
K/Cl	0.64	1.47	0.81

(3) P1对农艺和产量、产值性状的影响:从表6看出,P1有促进烟叶生长、改善烟叶收购等级、提高产量、增加产值的作用,但菌核净在这些性状上表现更好。

表6 不同处理烟草产量、产值性状

Table 6 Agronomic and economic properties of cured leaves of tobacco as related to application of P1 and dimechachlon (Dim)[1)]

性状	测定值			增高(%)	
	CK	P1	Dim	P1	Dim
株高	106	108	104	1.9	−1.9
最大叶面积	2053	2284	2459	11.3	19.8
产量	2559	2615	2975	2.2	16.3
上中等烟叶比例	88.5	95.4	96.3	6.9	7.8
平均价格	3.82	4.32	4.44	13.1	16.2
产值	9778.8	11298.6	13206.8	15.5	35.1

1) 沂南试验点资料。

三、讨　论

1. 本文的目的和意义

任何一种病害控制措施都必须兼顾对作物其他性状的影响,这是诱导抗性利用的一个优势,即可以把病害控制与对其他性状的改善结合起来。本研究是关于细菌诱导的抗病性在生产应用中多种有益作用的一个基本测定程序,有3个方面的直接意义:①可以作为

有关研究的一个试验技术体系使用；②从中发现某个菌株在某方面的应用潜力并定向研究；③为这种应用研究提供了一个“菌株库”。更进一步的工作是想在两个机制层次上作理论和应用方面的探讨：①细菌诱导引起的烟草表面结构变化及与此相对应的赤星菌侵染行为的变化（互作导误[9]）；②细菌抗性诱导作用的生化基础和烟草反应的分子生物学（如菌体脂多糖诱导烟草富含羟脯氨酸的糖蛋白的积累[10]、植物病程相关蛋白的诱导及分子遗传[1]），我们将陆续报道有关研究结果。

2. 关于细菌抗性诱导作用的形式和条件

诱导抗性的非专化性提供了从不同生物和非生物因子中筛选抗性诱导因子的可能[4]，对非病原细菌抗性诱导作用的确认要先排除它们拮抗作用的可能，再以排除表面占据作用的方式将其引入植物。试验所测 60%的菌株具有诱导烟草抗赤星病的能力，并表现出 5 个特点：①细菌诱导的抗病性是系统性的；②抗性诱导效应在菌株间差别很大，效应大小与诱导接种量关系密切，但与菌株的生态来源没有直接关系；③细菌可用多种方法诱导烟草产生抗病性，叶面喷洒和灌根诱导的有效性对直接应用是很有利的；④诱导抗性可以比较持久地表现出来；⑤提高诱导接种菌量、选用适宜的诱导方法，可以有效地增强细菌的抗性诱导效果。

3. 菌株 P1 实际应用的潜力

在选择田间应用的菌株时，除了它的抗性诱导作用大小外，对烟草叶面的适应性、操作 的简便性也是考虑的因素。当只选用少数菌株时，有可能难以达到预期目的，因为一个菌株很难在各方面都表现优异，菌株 P1 就是这种情况。它控制赤星病的效果并不理想，但改善烟叶内在品质的作用非常优异，表明它在卷烟工业上比在农业上更有应用价值，值得对它在烟叶复烤后贮存和烟制品质量改善方面的作用进行研究。如果循着直接应用的途径进行探讨，表 1、表 2 提供的“菌株库”就可以成为在控制病害和改善烟叶质量两方面作进一步筛选的材料。

参 考 文 献

[1] 王金生，细菌素在植物细菌病害生防中的应用，生物防治通报，1985，**1**(2)：36－40。

[2] 何礼远，细菌在植物病害生物防治上应用研究的进展，生物防治通报，1985，**1**(8)：28－31。

[3] 刘进元等，抗菌蛋白 LCIIB 的纯化及性质，微生物学报，1993，**33**：268－273。

[4] 董汉松，植物诱导抗性的机制和应用前景，赵可夫主编，植物抗性生理研究，济南：山东科学技术出版社，1992，193－201。

[5] 董汉松等，烟草赤星病菌致病力测定方法的研究，山东农业大学学报，1989，**20**(4)：1－8。

[6] 董汉松等，三类因子在烟草抗赤星病诱导中的作用，山东科学，1993，**6**(2)：47－52。

[7] 董汉松等，烟草赤星病菌致病力分化与弱毒株抗性诱导作用的研究，植物保护学报，1992，**19**：87－90。

[8] 董汉松等，烟草赤星病损失估计模型的建立方法。中国烟草学报，1993，**1**(4)：67－70。

[9] 董汉松等，根据植物-病原物互作控制烟草赤星病的途径。山东科学，1993，**6**(2)：1－9。

[10] Wycoff, K. J. et al., Hydroxyprolin-rich glycoproteins in plant-microbe interactions and development. Verms DPS ed. Molecular Signals in Plant-Microbe Communications. Boca Raton, Ann. Arbor, London: CRC Press, 1992, 407－422.

INDUCERS OF TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT: 3. NONPATHOGENIC BACTERIA AND THEIR APPLICATION IN FIELDS

Dong Hansong, Liu Aixin, Zhang Chengxi, Gao Mingyou, Zhu Guangzhen, Lin Yongzhu, Sun Xiaoping, Yang Xianying, Zhang Xiuguo, Liu Guangliang and Tian Fuhai

Fifty two strains of nonpathogenic bacteria from different ecosystems of tobacco, tomato and cucumber were tested for their role of inducing tobacco resistance to brown spot (*Alternaria alternata*), and 60% strains gave over 20% effect of the resistance induction. A strain of *Pseudomonas fluorescens*, P1, was selected for studies of biology in the resistance inducing and application in the fields. Ability of P1 to induce systemic resistance of tobacco to the disease was conditioned by bacterial numbers in suspension, method of induction treatment, and stage when the challenge inoculation, by a virulent strain, TBA28, of the pathogen was made. Over 10^5 cfu/ml bacteria was needed as the lowest dosage for the resistance induction; root pouring and leaf spraying were best of 5 methods tested in induction treatment; the induced resistance was able to last at least 40 days with gradual decrease. In fields, the preparation of P1 showed three roles. It made the disease reduce at 20—50%, and made quality of the cured leaves smgnificantly improved with desirable contents of different chemical components. It was also able to increase output (over 2%), proportion of the first-class leaves (7%), and output value (16%) of tobacco.

烟草抗赤星病的诱导因子谱：
4. 病毒因子诱导的抗病性及诱导抗性向再生植株传递

董汉松　刘爱新　孙衍坤
杨献营　王智发　郑继法　孙运达

植物诱导抗病性的非专化性有两种表现：对某种病害的抗性可由不同因子诱导；一种因子诱导的抗病性常对抵抗不同病害都有效[1]，这就使人们能在不同因子中找到效果最好的诱导因子。诱导抗性在分子、生化、细胞、组织水平上有不同的机制，使人们有可能通过不同途径把它用于病害控制[2]。在这种背景下，董汉松等[3,4]首先开始作了以控制烟草赤星病为目标的有关研究，建立了包括赤星菌弱毒株、非病原细菌、病毒、化学物质在内的诱导因子谱[5]，并在两种利用途径的探讨上取得理想结果：①根据病菌孢子壁具有激发子(elicitor)功能的物质这一假设，直接用弱毒株孢子壁制剂防治赤星病[6]；②根据植物体细胞无性系变异(SV)原理，采用两条路线改造现有品种的抗病性。一是毒素胁迫抗病性变异，已获得抗病的二代苗和种子(NC89-TT)[8]；二是诱导抗性通过SV操作程序向再生植株转移，期望表型上不遗传的诱导抗性能为SV的自发变异[7]所加强或稳定化、并传递给再生株和它的种子。根据前人的经验，病毒因子诱导的抗病性比较容易通过组织培养传递给再生植株[1,6]。本文报道从对烟草抗赤星病诱导的病毒因子筛选到获得抗病的再生植株后代的主要结果(1991－1993年)。

一、材料和方法

1. 烟草品种和赤星菌菌株

烤烟品种G140、K326、NC89、NC82由山东农业大学烟草研究室繁殖保存；病菌菌株TBA28属强毒株[3]，用于对诱导后烟草作挑战接种和对再生植株作抗病测定。

2. 病毒毒源

CMV、PVY-T1和TVBMV由本校烟草研究室分离、保存在品种G140幼苗上，诱导接种时直接从毒源植株上取样；N14和SV52由中国科学院微生物研究所提供，液体毒样在0－4℃下保存，使用前摩擦接种3－4叶期幼苗进行繁殖。

3. 诱导抗性的测定

分两项：第一项是筛选有效的病毒因子及组合。按通常方法(0.02mol/L、pH7.2的磷酸缓冲液等体积研磨)得到病毒汁液，分单因子和2－4复因子(等量混合)共16个组合(表1)，摩擦接种5－6叶期烟苗的顶部两片嫩叶，烟草放在温室(16－25℃)内，第10天用赤星菌TBA28的孢子(10^5±/ml)悬浮液在第4、5真叶上挑战接种[3]。每种组合各接种

6 棵烟苗，以磷酸缓冲液摩擦嫩叶并同样挑战接种为对照。第二项是诱导抗性表现时期的测定，病毒用 N14，烟草品种是 NC89，采用分期诱导、一次挑战接种的方法，诱导处理后到挑战接种的时间间隔分 5、7、10、20、30、50 天。在以上两项测定中，均在诱发病害[4]后计测病斑直径、面积，抗性诱导效应表示为病斑面积比对照减小的百分数。

4. 再生植株的产生过程

烟苗按上法用 SV52 和 N14 诱导后第 30 天，从心叶取叶碟(0.5×0.5cm)，依文献[8]的方法诱导植株再生。大致过程是：叶碟在 MS-11 培养基上诱导愈伤组织，21－28 天时继代在 MS-2 培养基上；再过 21 天转到 MS-3 培养基上诱导芽的分化，至长出芽点时再移植一次；等芽长到 1－2cm 时转到 MS-43 培养基上，约 28 天芽段的根系已完全长好。整个组织培养过程的条件是：温度，25－28℃；相对湿度，50%±；光-暗周期，8－16 小时；光强，1 000－1 500lux。最后到原生苗 3－5 叶时移入花盆(12×12cm)，置温室内生长。分别在原生苗移栽时和盆中再生株作抗病性测定前汰除形态畸变的幼苗。

5. NC89-V1 和 NC89-V2 的获得

经病菌(TBA28)孢子悬滴接种后，将抗病性表现最好的一代再生株移到大花盆(23×23cm)中培育至结籽，从经 N14 诱导的 NC89 幼苗叶碟再生的植株上获得的种子定名为 NC89-V1，经 SV52 诱导的，种子定名为 NC89-V2，均保存在山东农业大学烟草研究室。

6. 再生植株抗病性测定

作抗病性测定的植株有 3 类：起始品种(NC89、NC82、K326)幼苗，作对照；它们的再生株一代苗；品种 NC89 再生株的二代苗，即 NC89-V1 和 NC89-V2 的幼苗。都是在 5－7 叶期、用菌株 TBA28 的孢子(10^5±/ml)悬滴接种第 3、4 真叶，按形态正常的再生株的多少各接种 6－8 棵苗；诱发病害后检测病斑直径；具体方法依文献[10]。

二、结　　果

1. 诱导抗性的特点

从表 1 可以看出病毒因子对烟草抗赤星病的诱导的作用有如下规律：①单因子诱导可以反映不同病毒的诱导效果，N14 和 SV52 明显地诱导抗病性，TVBMV 和 PVY-T1 则程度不等地诱导感病性；②凡含 SV52 的组合均有明显的抗性诱导效应，但复合诱导都减弱了 SV52、N14 的作用，TVBMV、PVY-T1 和 CMV 都有这种负效应；同时，SV52 和 N14 二者组合并不能相互增效；③病毒因子诱导的抗病性可以从植株上部叶传到下部(挑战接种的是下部叶)，是系统性的(接下来的组织培养取材于心叶，表明抗性可向上传导)。

第二个特点是时间效应(图 1)：诱导抗性在第 7 天开始表现，30 天最高，然后缓慢减弱，但可持续保持到第 50 天。

表 1　病毒及其组合诱导烟草抗赤星病的效果

Table 1　Resistance inductory effects of virus inducers and their combinations

诱导组合*	病斑面积(mm^2)	诱导效应(%)
N14(hypovirulent ToMV)	11.11	57.07
CMV + SV52 (satellite-RNA containig CMV)	29.87	-15.42
CMV+N14+SV52	30.14	-16.46
CK	28.88	
SV52	31.35	83.16
TVBMV	200.96	-7.94
PVY-T1	254.34	-36.61
N14+SV52	40.69	78.14
N14+TVMBV	116.83	27.25
N14+PVY-T1	195.97	-5.26
SV52+TVBMV	105.62	43.27
SV52+PVY-T1	167.33	10.12
TVBMV+PVY-T1	254.34	-36.62
N14+SV52+TVBMV	33.29	82.12
N14+SV52+PVY-T1	140.95	24.29
SV52+TVBMV+PVY-T1	171.95	7.64
N14+SV52+TVBMV+PVY-T1	178.98	3.85
CK	186.17	

注：上面 4 项用的品种是 NC89，下面是 G140。

2. 诱导抗性向再生植株的传递

表 2 的结果充分表明，当亲本品种经病毒(N14、SV52)诱导获得抗病性时，诱导抗性可以向上传到新生叶上，由这种心叶经组织培养又可以把抗病性传递给再生植株的第一代苗，而且抗病程度都比亲本起始材料当代苗获得抗性有明显提高，幅度为 3%(NC89)－25%(NC82)。另有两点值得注意：①SV52 和 N14 在诱导当代苗抗病性的效果与诱导抗性向再生株传递的效果方面有所差别，SV52 可使当代苗获得较高的抗性，而 N14 诱导的抗性在再生株上有明显提高；②测定 3 个品种的目的是想了解这种路线的适应面，结果是肯定的；出于实用目的和研究的连续性，对品种 NC89 需要积累系统的证据。

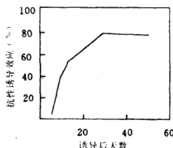


图 1　病毒抗赤星病诱导效应的时间变化

Fig. 1　Time sequence of resistance inductory effects of virus N14

表 2 病毒诱导的抗病性及其向再生株传递的情况

Table 2 The expressions of the virus(N14 and SV52)-induced resistance to transfer tobacco regenerants *via* tissue culture

品 种	挑战接种后病情	当代苗			再生株第一代苗		
		CK	SV52 诱导	N14 诱导	CK	SV52 诱导	N14 诱导
NC89	病斑面积(mm^2)	28.88	4.90	11.11	5.55	0.43	0.75
	面积减小(%)		83.03	57.07		89.55	86.49
NC82	病斑面积(m^2)	9.69		4.87	9.69		2.46
	面积减小(%)			49.74			74.61
K326	病斑面积(mm^2)	49.90		20.96	49.90		6.90
	面积减小(%)			58.00			86.17

3. 诱导抗性在再生植株第二代上的表现

由表 3 可知,N14 和 SV52 诱导的抗病性传递给再生植株后,可经过种子在二代植株上得到表现,抗病程度比在再生株第一代苗上略有降低,但还是比较理想(74%、81%)。

表 3 再生株二代苗对赤星病的反应

Table 3 The resistance degree of the second progenies of tobacco regenerants

烟草类别	挑战后病斑面积(mm^2)	病斑面积降低(%)
NC89	60.67	CK
NC89-V1	6.11	80.72
NC89-V2	15.83	73.97

三、讨　论

从以上结果首先可以看到诱导抗性与 SV 结合在现有品种抗病性改造中的潜力:当代植株的获得抗性经 SV 程序后不仅可以向种子传递,还在抗性程度上得到明显加强,比诱导抗性经常规的植株繁殖而传递的效果高 2—3 倍(参见文献[10]中的表 5)。这就提出了病毒利用的另一种途径。例如,著名的病毒疫苗 N14 不但可以交叉抵抗强毒株的侵染,还能诱导烟草(当代植株)对真菌病害的抗性,这种功能虽然表明 N14 的直接施用价值更广泛,但通过 SV 途径有希望获得可以遗传的诱导抗性(对此有争论)[1,2,10,11],其实用潜力已超过借无性繁殖技术对这种 SV 传递的抗病性进行利用的设想[1,2];沿此路线把 NC89-V1、NC89-V2 之类的材料引向品种化就有了实际可行性,这还因为 NC89 是一个引进的、目前国内当家的优质、高感赤星病的品种[6]。但从室内抗病材料到品种化还要做多方面的工作[8],最主要的是抗病性在后代植株上能否稳定遗传和表达。

在理论上,本研究涉及多方面尚无一致答案的问题,主要是:①病毒因子诱导的抗病性比较容易通过组织培养向再生植株传递[1,6],说明这种诱导抗性可以为 SV 所强化[2];

②病毒衣壳蛋白或其特定功能基因与植物表面某特定成分有一种结构互补关系(接触识别的基础),进入植物体后多数(包括本试验所用病毒)可以系统传导(在这两个环节上的竞争是表1所示复合因子带来抗性诱导负效应的一种可能的原因[12]);③植物在抗性诱导过程中产生的10多种PRP(病程相关蛋白)的病理学作用多是非专化性的,专化性的作用只见于对病毒复制的抑制(如菜豆PRP对苜蓿花叶病毒[13])。这三者之间显然有一种联系:植物诱导抗性对病毒的作用和病毒作为抗性诱导因子的作用比其他体系有更多的专化性,病毒基因组相对简单、衣壳蛋白组分以一个生物化学上的单因子与植物接触识别[12],这就使病毒的抗性诱导作用更有可能直接影响植物的DNA序列(有转录还是转译水平上的诱导之争[11,13];实际上,已有研究表明烟草β-1,3-葡聚糖酶的诱导与酶基因启动子的被激活有关[14])。关于N14和SV52对烟草抗赤星病的诱导是否遵循上述假设,很有深入研究的价值,因为人们近年来在植物抗性诱导过程中陆续发现不同的PRP,它们的病理学功能有一定的病原物针对性[11],这对无论从生化(如内源激发子)还是分子遗传(如PRP基因的启动子)上进一步利用诱导抗性都是有益的思路。

参 考 文 献

[1] Kuc, J. CORESTA Inf. Bull., 9th Tob. Sci. Cong., 1988, 25—40.
[2] 董汉松,植物抗性生理研究(赵可夫主编),山东科学技术出版社。1992,193—201。
[3] 董汉松等,植物保护学报,1992,**19**:87—91。
[4] 董汉松等,植物保护学报,1993,**20**:129—134。
[5] 董汉松等,烟台师范学院学报(自然科学版),1993,**9**(2):57—61。
[6] 董汉松等,山东科学,1993,**6**(2):1—9。
[7] 董汉松等,山东科学,1993,**6**(2):53—60。
[8] Wernsman, E. A., CORESTA Inf. Bull., CORESTA Symp. 1990, Kallithea, Greece, 55—84.
[9] 董汉松等,山东农业大学学报,1989,**20**(4):1—8。
[10] 谈　文等,中国烟草学会第二次会员代表大会会刊,中国烟草学会编,1992,107—114。
[11] Cole, G. T., Hoch, H. C., The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. Plenum Press, New York and London, 1992, 347—362.
[12] Verma, D. P. S., Molecular Signals in Plant-Microbe Communications, CRC Press, Inc., Boca Raton., 1992, 423—443.
[13] 杜良成、王　钧,植物生理学通讯,1990,4:1—6。
[14] Castresana, C., The Plant Cell, 1990, **2**:1131—1143.

INDUCERS OF TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT: 4. VIRUS-INDUCED RESISTANCE AND ITS TRANSFERABILITY TO THE REGENERATED PLANTS AND THEIR PROGENIES *VIA* TISSUE CULTURE

Dong Hansong, Liu Aixin, Sun Yankun,
Yang Xianying, Wang Zhifa, Zheng Jifa and Sun Yunda

Function of viruses to induce tobacco resistance to brown spot and transfer of the induced resistance to the tissue culture originated regenerated plants and their progenies were studied. 5 viruses (CMV, TVBMV, PVY necrotic strain PVY-T1, satellite-RNA containing CMV strain SV52, and hypovirulent strain N14 of ToMV) were used as inducers in 16 combinations of 1—4 viruses. N14 and SV52 were able to induce systemic resistance of tobacco to the disease at 57% and 83% effects when a strong virulence strain, TBA28, of *Alternaria alternata* were used as challenger to inoculate cvs NC89, NC82, and K326. The combinations containing N14 or/and SV52 gave 10—78% inductory effects which was decreased by combining each 1, 2, and 3 of PVY-T1, TVBMV, and CMV which induced susceptibility of the plant to the disease when acted as a singal inducer. The induced resistance by both N14 and SV52 was capable of transducting from the up to down parts of tobacco, and began to show at 7 days, peaked at 30 days and lasted at least 50 days after induction treatment. From the heart leaves of induced plants of the 3 cvs, leaf discs were cultured to produce regenerated plants. The regenerated plants increased resistance to brown spot at 75—86%, as comparing with their each parent. Seeds had been obtained from the resistant regenerated tobacco, and named as NC89-V1 which was from the N14-inducing NC89 plants, and NC89-V2 which was from the SV52-inducing NC89. The 2nd progeny seedlings of NC89-V1 and NC89-V2 enhanced resistance by 81% and 74%, comparing with their parent NC89.

三类因子对烟草抗赤星病诱导作用条件的研究

董汉松　于建立　卜晓东　尹东升　孙立松

植物的诱导抗病性虽在诱导因子和对病害的抵抗作用两方面表现出非专化性[9]，但某种作物对某种病害的诱导抗性常有一定的诱导因子种类，诱导处理的最好方法以及诱导抗性表达的强弱也因作物、病害及诱导因子的不同而不同[4]。同时，诱导处理方法和诱导抗性的表达的机制还与诱导抗性的利用途径有关[5]。董汉松、王智发[6]最近报道，烟草赤星菌弱毒株可以诱导烟草对赤星病产生系统抗性，但考虑到病菌弱毒株在直接应用中可能发生的副作用（如致病力变强等）[5]，因此有必要建立烟草抗赤星病诱导的诱导因子谱，以根据不同因子的诱导方式和诱导抗性表达机制，利用诱导抗性对赤星病进行防治。本文报道这方面的初步研究结果（1991—1992）。

一、材料和方法

1. 材料

（1）烟苗：所用烟草品种为 G140，在盆钵（直径 12cm）中长到 9—10 叶期用于诱导处理。

（2）挑战菌株：TBA28 为烟草赤星病菌（*Alternaria alternata*）的强致病力菌株，按以前使用的方法[7]保存和繁殖。

（3）诱导因子：三类诱导因子是：①化学因子 IRD1、IRD2、IRD3 制备后在 4℃下保存，使用时诱导浓度（m/v）分别调到 0.2/1000、0.4/1000、0.1/1000，pH 均为 7.5；②细菌因子，菌株 C_2、C_8、C_{11} 从烟草茎部组织分离，经接种证明为非病原细菌，在普通肉汁培养基[1]上保存和繁殖，诱导接种的菌悬液浓度为 10^7 细菌/ml；③在测定的 6 个赤星菌菌株中，TBA16 和 TBA33 从山东临朐和平邑烟区烤烟、TBA202 和 TBA204 从贵州铜江烟区烤烟、TBA43 从广东阳春烟区马里兰烟、TBA303 从希腊 Thessaroniki 烟区的 Basma 香料烟上分别采集病叶并分离得到，按 Simmons（1967）[12]的描述和致病力测定[7]鉴定为 *Alternaria alternata*（Fr.）Keissler，诱导接种用孢子悬浮液，通常诱导浓度为 10^{5-6} 孢子/ml。

2. 诱导接种方法

不同因子诱导接种方法有 6 种，均处理 6 株烟苗，对另 6 株烟苗用灭菌水同样处理为对照。

（1）茎部注射：于烟苗茎基部周围多点注射，每株 0.25ml 注入茎的维管束内。

（2）叶部注射：在烟苗第 4、5 真叶上多点注射（Filtration 方式[3]），每片叶注射量为 0.25ml。

(3) 伤口接种：用于细菌因子。在烟苗茎基部破伤表皮，以灭菌脱脂棉球敷于伤口处并用透明胶带固定，48 小时内定期滴注菌液使棉球保持湿润。

(4) 灌根接种：按每株烟苗 50ml 的量注入盆钵内幼苗根部周围，接种前后两天内不浇水。

(5) 叶面喷洒：用长江-08 型喷雾器喷洒，以每片叶上附着细密雾滴但不流淌为度，接种后保湿 48 小时。

(6) 叶面悬滴：按文献[6]的方法进行，接种幼苗第 4、5 真叶，每片叶接种 10－12 滴，每滴约 25μl，接种后保湿 48 小时。

3. 挑战接种及结果检查方法

按上述 6 种方法诱导处理的烟苗在温室（温度为 30℃±）放置（方法 1－4）或保湿（方法 5、6）48 小时，再在 30℃±下放 3 天后按叶面悬滴法[6]进行挑战接种，接种部位为烟苗第 7、8、9 真叶，对照是用 1%灭菌葡萄糖溶液对空白诱导的烟苗进行接种，病害诱发和检查方法同前[7]，抗性诱导效应表示为位点发病率和病斑直径降低的百分数[6]，列表表示时取平均值。

二、结　　果

1. 化学因子的抗性诱导效果

由表 1 可知，3 种化学因子按 4 种方法对烟苗进行诱导处理均不能明显降低位点发病率，但可程度不同地减小病斑直径。诱导抗性还是系统性的，在远离诱导部位的第 7－9 真叶上，病斑直径均明显减小。

抗性诱导效应在诱导因子种类间有明显差别，IRD3 抗性诱导效应非常微弱；IRD1 效果最好，去除系统误差的影响后，抗性诱导效应最高仍达 54.5%。诱导处理方法间的差别也比较明显，从诱导抗性的全株表现来看，以叶面喷洒效果最好，其次是叶部注射（IRD1）或灌根（IRD2）。

2. 细菌因子的抗性诱导效果

由表 2 可以发现 3 种趋势：①细菌因子诱导的抗病性主要表现为病斑直径减少，但不能降低位点发病率；②诱导抗性是全株性的，可从诱导部位传导到上部 3 张挑战接种叶，第 9 真叶是挑战接种时烟株最上部一片成长叶；③诱导因子间及诱导处理方法间差别较大，如去除系统误差的影响，菌株 C_{11} 抗性诱导效应很微弱，C_8 抗性诱导效应稍强，C_2 抗性诱导效应比较明显，可达 39.2%（灌根，第 9 真叶）。同时还可看出，菌株 C_2 诱导的抗病性能在上面叶片得到较强的表达，尤以最上部成长叶比较明显。在 5 种诱导处理方法中，以灌根和叶面喷洒效应最好，前一种方法抗性诱导效应最高为 42.3%，后一种方法最高为 42.0%。

表1　3种化学因子对烟草抗赤星病的诱导效应

Table 1　The resistance inductory effects of 3 chemicals when used in different methods

诱导方法	挑战部位	IRD1		IRD2		IRD3	
		位点病率降低(%)	病斑直径减小(%)	位点病率降低(%)	病斑直径减小(%)	位点病率降低(%)	病斑直径减小(%)
叶部注射	第7真叶	16.7	43.2	5.6	35.8		
	第8真叶	25.0	28.8	0	25.5		
	第9真叶	29.2	62.1	0	16.3		
茎部注射	第7真叶	0	27.0			11.1	11.8
	第8真叶	4.2	26.0			0	21.0
	第9真叶	0	19.9			0	8.9
叶面喷洒	第7真叶	12.5	33.8	0	31.8	0	0
	第8真叶	0	34.5	0	20.9	0	0
	第9真叶	8.3	71.1	11.1	14.5	0	11.2
灌　根	第7真叶	0	31.4	5.6	22.5	0	27.8
	第8真叶	0.8	19.9	16.7	33.7	0	16.8
	第9真叶	0	19.9	11.1	36.1	0	16.4
系统误差*			−16.6−13.3		−16.4−17.2		−2.2−3.7

* 对照中最小与最大观察值的离均差与均值的百分比，下同。

表2　3个非病原细菌诱导烟草抗赤星病的抗性诱导效应

Table 2　The resistance inductory effects of non-pathogenic bacteria when used in different methods

诱导方法	挑战部位	C_2		C_8		C_{11}	
		位点病率降低(%)	病斑直径减小(%)	位点病率降低(%)	病斑直径减小(%)	位点病率降低(%)	病斑直径减小(%)
叶部注射	第7真叶	0	0	8.3	37.5	4.3	27.8
	第8真叶	0	0	8.3	0	4.3	40.6
	第9真叶	0	37.9	0	22.7	0	23.4
茎部注射	第7真叶	0	12.6	16.7	29.3	0	39.0
	第8真叶	0	7.9	8.3	0	12.5	26.8
	第9真叶	4.2	10.3	0	27.7	11.1	11.4
伤口接种	第7真叶	0	6.2	12.5	31.2	5.6	37.0
	第8真叶	0	23.1	0	3.2	5.6	13.9
	第9真叶	0	37.9	0	28.2	0	11.7
叶面喷洒	第7真叶	0	0	11.1	34.3	12.5	24.9
	第8真叶	0	0	4.2	11.9	20.8	26.4
	第9真叶	0	42.0	4.2	10.5	0	27.6
灌　根	第7真叶	4.3	19.2	0	52.7	16.7	34.4
	第8真叶	0	3.8	0	12.5	0	24.0
	第9真叶	0	42.3	0	34.2	0	36.7
系统误差			−3.1−5.8		−22.0−15.5		−14.7−11.7

3. 赤星菌菌株的抗性诱导效果

首先用叶面悬滴诱导法对 6 个菌株作了测定，表明菌株间抗性诱导效应有所不同(表 3)，菌株 TBA303 较差；TBA33 较好，去除系统误差后抗性诱导效应为 46.3%。

表 3　赤星菌 6 个菌株在叶面悬滴诱导时对烟草抗赤星病的诱导作用

Table 3　The resistance inductory effects of 6 strains of *A. alternata* in challenge stage tests

菌　株	第 7 真叶挑战		第 9 真叶挑战	
	位点病率降低(%)	病斑直径减小(%)	位点病率降低(%)	病斑直径减小(%)
TBA16	5.0	40.7	0	26.2
TBA33	0	43.7	4.5	54.0
TBA43	0	46.5	0	30.3
TBA202	8.3	34.5	0	22.2
TBA204	8.3	35.4	0	49.3
TBA303	0	18.8	4.5	37.2
系统误差		−6.7—6.9		−6.7—6.9

然后选抗性诱导效应中等的菌株 TBA16 测定诱导方法对诱导抗性的影响，表 4 是去除了系统误差后的抗性诱导效应统计值。所有方法均可明显减小病斑直径，其中以叶面喷洒和叶面悬滴效果更好，叶面喷洒还可明显降低位点发病率。

表 4　赤星菌菌株 TBA16 诱导烟草抗赤星病的情况

Table 4　The resistance inductory effects of the pathogen TBA16 conditioned by induction methods

诱导方法	位点发病率下降(%)	病斑直径减小(%)
叶部注射	7.2	24.7
茎部注射	5.4	11.8
叶面喷洒	28.6	39.1
叶面悬滴	7.3	37.9

注：挑战接种部位为第 9 真叶。

三、结论和讨论

1. 关于诱导抗性的表达方式

三类因子诱导烟草后均不能明显降低位点发病率(挑战悬滴接种位点产生赤星斑的百分率)，而可以比较明显地减小病斑直径，说明抗性诱导不能增强烟草的抗侵入能力，而是增强了烟草对病菌致病性扩展的抵抗能力，诱导抗性表达的这种形式可以引导对于机制的多方面研究，例如对与这种诱导抗性表达形式有关的组织病理学和生理生化学[4]进

行研究，将有助于从机制上探讨诱导抗性应用的途径。

2. 关于诱导抗性的系统性

最近的报道[6]表明赤星菌弱毒株诱导的烟草对赤星病的抗性具有在植株体内传导的能力，本研究表明化学和细菌因子诱导的抗病性也是系统性的，尤其在灌根诱导时表现得更为明显，系统性诱导抗性被认为是免疫信号传递的结果[10]，对从多方面利用诱导抗性控制病害是很有利的。

3. 关于诱导抗性的表达程度

与作者已报道的结果[6]相比，本研究中测定的诱导抗性程度最低相差 30－40％，诱导抗性最高为 50％左右，这一结果显然是不理想的。但它的意义在于可以引导诱导抗性生物学或表达条件方面的研究，以便为有效因子的筛选测定提供基础。董汉松等的另一项研究[8]表明，诱导抗性表达的强弱与挑战接种后的保湿时间有关，尤其取决于抗性诱导期和病害诱发期[4]的温度。温度过低不利于发病而掩盖了抗性诱导效应，而温度过高使诱导抗性基因倾向于"表达隐闭"状态[2]。人们一般认为抗性诱导的作用是增强了诱导抗性基因表达的程度和幅度[11]，因此有必要也有可能通过调节诱导条件提高诱导抗性强度。

4. 本研究与应用有关的问题

本研究直接提出了诱导抗性应用的可能：建立了烟草抗赤星病的诱导因子谱，并表明不同因子各有其比较的诱导方法；灌根和叶面喷洒可以获得较好的效果，这对诱导因子的直接利用是很方便的，利用诱导抗性防治病害的 5 条途径[4]均需就有关机制及应用的无公害性[5]等问题进行研究，我们将陆续报道这方面的研究结果。

参考文献

[1] 方中达，植病研究法，北京：农业出版社，1979，82。
[2] 张元恩，植物诱导抗病性研究进展，生物防治通报，1987，**3**(2)：88－90。
[3] 董汉松，植物识别子与病原细菌识别子间的相互作用，植物生理学通讯，1991，**27**：391－396。
[4] 董汉松，植物抗性生理研究，济南：山东科学技术出版社，1992，193－201。
[5] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌不同菌株在 11 种培养基上的生长产孢能力，中国烟草，1989，**3**：1－9。
[6] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力分化和弱毒株抗性诱导作用的研究，植物保护学报，1992，**19**：87－90。
[7] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力测定方法和研究，山东农业大学学报，1989，**20**(4)：1－18。
[8] 董汉松，烟草侵染性病害防治面临的难境与对策，中国烟草，1990，**2**：10－13。
[9] Key, J. and T. Kosuge, Cellular and Molecular Biology of Plant Stress. New York: Acan. R. Liss Inc., 1985, 303－311.
[10] Kuc. J., Expression of latent mechanisms for resistance to blue mold and other disease in tobacco. CORESTA Inf. Bull. 9th Tob. Sci. Cong., 1988, 25－43.
[11] Kuc, J. and C. Preisig, Fungal regulation of disease resistance mechanisms in plants. Mycologia, 1984, **75**: 767－784.
[12] Lucas, G. B., Diseases of Tobacco (3rd ed), NC, Raleigh: BCA., 1975, 267－296.

CONDITIONS OF 3 INDUCERS TO ELICIT TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT

Dong Hansong, Yu Jianli, Bu Xiaodong,
Yin Dongsheng and Sun Lisong

By 6 methods of inducing treatment and droplet inoculation challenge, the induced resistance of tobacco to brown spot was tested. The inducers included 3 chemicals, 3 strains of nonpathogenic bacteria, and 6 strains of brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. All of the inducers showed function of inducing systemic resistance of tobacco to the disease at different levels. The better effects of resistance induction were given by the chemical inducer IRD1, by nonpathogenic bacterum strain C_2, and by the pathogen strain TBA33. Among the 6 methods of induction treatment, leaf spraying and droplet inoculation were better for the pathogen strain inducers, while leaf spraying and root pouring for the chemical and bacterial inducer.

赤星菌弱毒株 TBA16 对烟草抗赤星病诱导作用条件的研究

董汉松　于建立

鉴于烟草赤星病在我国发生的普遍性和严重性以及目前防治措施的局限[4]，作者试图将诱导抗性用于防治，经致病力分化研究和病菌（*Alternaria alternata*）不同菌株抗性诱导效应测定，证明弱毒株 TBA16 可以明显地诱导烟草对赤星病产生系统抗性[5]。此后试图从 5 个方面探讨诱导抗性利用的途径[7]，研究中发现如何改进诱导条件，提高诱导抗性表现程度是一个限制性问题，本文报道这方面的研究结果（1991 年进行研究）。

一、材料与方法

1. 材料

（1）烟苗：烤烟品种 G140 移栽在花盆（直径 12cm，每盆 1 棵烟苗）中后长到 9－10 叶期用于诱导接种。

（2）挑战菌株：TBA28 是赤星菌的强致病力菌株，按董汉松等[2]的方法保存、繁殖并制备孢子接种体，孢子含量通常调到 10^6/ml。

（3）诱导因子：赤星菌弱毒株 TBA16 的孢子接种体按董汉松等[3]的方法制备，孢子含量调到 10^5/ml；毒素诱导液按董汉松等[6]的方法制备。

2. 诱导处理方法

采用 4 种方法，均处理 6 株烟苗，并各对另 6 株苗用灭菌水同样处理为“空白诱导”对照。

（1）叶部注射：在烟苗第 4、5 真叶上以均等距离将诱导接种体（液）注射于上表皮与叶肉组织之间，每片叶注射 0.25ml；放在 24℃左右条件下。

（2）茎部注射：在烟苗茎基部周围多点注射，每株 0.25ml 注入维管束内；放在 24℃左右条件下。

（3）叶面喷洒：用长江-08 型小喷雾器喷洒，以烟苗每片叶附着细密雾滴但不流淌为度，接种后在 24℃左右保湿 48 小时。

（4）叶面悬滴：按董汉松等[5]的方法接种幼苗第 4、5 真叶，然后在 24℃左右保湿 48 小时。

3. 挑战接种和结果检查

烟苗诱导接种后第 5 天，按叶面悬滴法[5]对第 9 真叶进行挑战接种，每片叶在上表面以均等距离接种 10－12 滴，每滴约 25μl，以灭菌的 1％葡萄糖溶液对“空白对照”的烟苗

作同样接种为对照。病害诱发期间通常温度为24℃左右，第5天检查病斑直径，抗性诱导效应表示为病斑直径减小的百分率，以各处理的平均值计算。

二、试验结果

1. 不同诱导方法的抗性诱导效果

由表1可知，叶部和茎部注射的抗性诱导效应都很微弱，叶面喷洒和悬滴的抗性诱导效应比较明显。以叶面悬滴法诱导时，在烟苗第4、5真叶诱导可使第9真叶挑战接种后病斑直径减小，因此，诱导抗性是系统性的。

2. 诱导抗性的时间变化和重复诱导的效果

用菌株TBA16的孢子悬浮液按叶面悬滴法对烟苗进行诱导接种后1、3、6、9、12、15、18、21、28、35天分别进行挑战接种，结果(图1)表明，诱导抗性在诱导处理后6天开始表现，第12天达到高峰，第21天开始减退。因此，抗性诱导期(诱导抗性开始表现的时间)、诱导抗性最大期和持续期分别为6、12和21天。

表1　赤星菌弱毒株TBA16诱导烟草抗赤星病的情况

Table 1　The effects of induction methods

诱导方法	病斑直径(mm)		抗性诱导效应
	对　照	诱　导	病斑直径减小(%)
叶部注射	18.8	16.4	12.8
茎部注射	26.5	23.4	11.0
叶面喷洒	19.9	13.1	34.1
叶面悬滴	28.9	17.2	40.5

注：诱导处理后第5天作挑战接种。

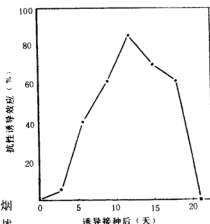


图1　病菌弱毒株TBA16对烟草抗赤星病诱导效应的时间变化

Fig. 1　Time sequence of induced resistance

在诱导抗性表现的开始期和最大期，分别对烟苗进行重复诱导，并于每次诱导后第6天进行挑战接种，结果(表2)表明，重复诱导可以明显增强诱导抗性，以重复诱导3次效果最好，可使抗性诱导效应由36.7－83%提高到57.5--100%。在诱导抗性最大期进行4次重复诱导，可使诱导抗性持续期延长到至少42天。

3. 温度等条件的影响

从表3可以看出，在3种对比条件中，以抗性诱导和病害诱发期间的温度对诱导抗性影响最大，抗性诱导效应在24℃左右最高，在温度偏低(16－20℃)、偏高(30℃左右)时分别减弱56.4%、51.3%。挑战接种后保湿时间偏长(60小时)也可明显减弱抗性诱导效应。根据这一组结果可知，用病菌弱毒株诱导烟草抗赤星病的适宜条件是：挑战接种浓度为10^8孢子/ml，挑战接种后保湿48小时，抗性诱导期和病害诱发过程中的温度保持24℃左右。

表 2 用病菌弱毒株 TBA16 重复诱导的烟草赤星病抗性发生情况

Table 2 The effects of repeating induction

重复诱导的时期	诱导次数	接种部位(第几真叶)		接种时间第1次诱导后(天)		病斑直径(mm)		抗性诱导效应(%)
		诱导	挑战	诱导	挑战	对照	诱导	
抗性表现始期	1	3、4	5、6		6	8.7	5.5	36.7
	2	5	6	6	12	9.4	4.0	57.5
	3	7	8	12	18	12.0	5.7	52.5
	4	9	10	18	24	18.9	12.1	36.0
抗性最大期	1	4、5	6、7		12	12.5	2.1	83.2
	2	6	7	12	18	22.2	0	100
	3	8	9	24	30	20.5	0	100
	4	10	11	36	42	27.2	10.4	61.8

表 3 温度等条件对 TBA16 抗性诱导作用的影响*

Table 3 Effects of environmental conditions

对比条件		其他条件	病斑直径(mm)		抗性诱导效应(%)
			对照	诱导	
挑战接种浓度(孢子/ml)	10^4	保湿 48 小时	8.7	2.5	71.3
	10^5	温度 24℃±	13.2	3.3	75.0
	10^6		17.5	3.8	78.3
保湿时间(小时)**	24	挑战浓度 10^6	13.5	5.2	61.5
	48	温度 24℃±	17.5	3.3	78.3
	60		23.7	15.6	44.5
温度(℃)***	16－20	挑战浓度 10^6	13.5	8.9	34.1
	24±	保湿 48 小时	17.5	3.8	78.3
	30±		15.5	9.6	38.1

* 按叶面悬滴法诱导接种第 3、4 真叶，挑战接种第 5、6 真叶。

** 挑战接种后的保湿时间。

*** 诱导接种后到检查结果期间(10 天)的温度。

4. 病菌毒素的抗性诱导作用

表 4 说明，毒素诱导明显好于孢子诱导的效果，并使叶部注射和茎部注射两种诱导方法也获得了明显的抗性诱导效应，诱导效果提高 35－77%。毒素诱导也是以叶面喷洒和叶面悬滴效果最好，在诱导后第 12 天作挑战接种时，抗性诱导效应可达 80% 和 100%。

表 4　病菌毒素对烟草抗赤星病的诱导效果

Table 4　The resistance inductory effects of AT-toxin

诱导方法	孢子的抗性诱导效应（%）*	毒素诱导，第 6 天挑战接种			毒素诱导，第 12 天挑战接种		
		病斑直径(mm)		抗性诱导效应(%)	病斑直径(mm)		抗性诱导效应(%)
		对　照	诱　导		对　照	诱　导	
叶部注射	12.8	8.7	5.3	39.1	15.6	6.3	59.6
茎部注射	11.0	16.7	8.7	47.9	15.6	5.5	64.7
叶面喷洒	34.1	8.7	5.3	39.1	21.9	4.3	80.4
叶面悬滴	40.5	16.7	6.3	62.3	25.0	0	100

*参见表 1。

三、讨　　论

1. 关于抗性诱导方法

诱导方法与抗性诱导效应间的关系因病害发生特点而异。烟草赤星病是局部性叶斑型病害，Kuc[9]认为在这类病害中诱导抗性是按过敏反应(HR)类似机制发生的，病菌菌株的抗性诱导能力与它们引起寄主组织坏死的能力有一定关系。作者的研究表明情况不完全是这样。赤星菌强毒株侵染引起的寄主组织坏死直接扩大为赤星病斑，但并不能使植株对病菌第二次侵染产生抗性；弱毒株并不引起寄主接种部位的明显坏死，但可穿过叶片在接种点背面生长[3]。叶面喷洒和悬滴诱导就是以此方式诱发抗病性的，本文表明这种系统性的诱导抗性可通过改善诱导条件而达到“免疫”的程度。Ye 等[11]研究表明，注射诱导可使植物对系统侵染的病害发生高度“免疫”作用。

2. 诱导抗性表达特点与提高抗性的途径

Kuc[10]认为，诱导抗性的强弱取决于植物诱导抗性基因的表达程度，诱导刺激的作用是使这种基因活化为“敏感状态”，当植物受病原物侵染时，“敏感状态”的基因即表达为抗病性[8]。诱导抗性有诱导期、最大期和持续期 3 个时间参数，很少是植物终生性的[7]。如果温度、光照等条件不适宜，诱导抗性基因就会关闭[1]。本研究表明，温度是影响弱毒株对烟草抗赤星病诱导作用的主要因素；重复诱导有提高抗性和延长抗性持续期两种作用，这与高等动物抗体产生中的回忆反应很相似[7]，对其原因值得进一步研究。

3. 本研究与应用有关的问题

本文提出了病菌弱毒株抗性诱导作用的一组适宜条件，表明叶面喷洒可获得良好效果，这就指出了弱毒株直接利用的可能性。毒素诱导可使抗性达到“免疫”的程度，这是因为毒素直接处理加强了诱导刺激强度和简化了基因对基因关系的结果[9]。对此作进一步研究，有助于从机制上探讨诱导抗性利用的途径。

参 考 文 献

[1] 张元恩,植物诱导抗病性研究进展,生物防治通讯,1987,**3**(2):88—90。

[2] 董汉松等,烟草赤星病不同菌株在11种培养基上的生长产孢能力,中国烟草,1989,**4**:1—9。

[3] 董汉松等,烟草赤星病菌致病力测定方法的研究,山东农业大学学报,1989,**20**(4):1—8。

[4] 董汉松等,烟草侵染性病害防治面临的难境与对策,中国烟草,1990,**2**:10—14。

[5] 董汉松等,烟草赤星病菌致病力分化和弱毒株抗性诱导作用的研究,植物保护学报,1992,**19**(1):87—90。

[6] 董汉松等,烟草对赤星菌毒素的快速反应及在品种抗病性鉴定中的作用,中国烟草学会第二次会员代表大会会刊(中国烟草学会编),1992,20—25。

[7] 董汉松,植物诱导抗性的机制和应用前景,植物抗性生理研究(赵可夫主编),山东科学技术出版社,1992,193—201。

[8] Key, J., Kosuge, T., Cellular and molecular biology of plant strees. Alan R. Liss, Inc., New York, 1985, 303—327.

[9] Kuc, J., Induced systemic resistance in plants to diseases caused by fungi and bacteria. In Bailey, J. A., Deverall, B. J. (eds.), The Dynamics of Host Defence. Academic Press, Sydney, New York, 1983, 191—221.

[10] Kuc, J., Expression of latent mechanisms for resistance to blue mold and other disease in tobacco. In: CORESTA Inf. Bull., 9th Tob. Sci. Cong., 1988, 25—43.

[11] Ye, X. S. et al., Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to blue mold and to tobacco mosaic virus. Phytopathol., 1990, **80**:1295—1299.

IMPROVEMENT OF CONDITIONS FOR INCREASING EFFECTS OF THE HYPOVIRULENT STRAIN TBA16 OF THE PATHOGEN (*ALTERNARIA ALTERNATA*) TO INDUCE TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT

Dong Hansong and Yu Jianli

The hypovirulent strain TBA16 of *Alternaria alternata* was tested for its function of inducing tobacco resistance to brown spot by 4 methods of induction inoculation with conidial suspensions. The leaf spray method and leaf droplet method gave good effects when the challenge inoculation with the virulent strain TBA28 was conducted after 6 days of induction treatments. In the treatment with droplet inoculation method, the systemic resistance of the plant expressed at 6 days, reached peak at 12 days, and lasted 21 days after inducing inoculation. The plants were induced repeatedly at 6 and 12 days after the last induction, respectively, which resulted in increasing induced resistance from 36—83% up to 100% by 3 times of induction, and in lasting expression of induced resistance from 21 days to more than 42 days by 4 times of inducing inoculation. The extension of expressing induced resistance was affected by the lasting time of high moisture of the challenge inoculated plants and by the temperature during resistance inducing treat-

ment. The resistance was higher at about 24℃ and decreased by 51.3—56.4% under 16—20℃ and over 30℃. The fungal toxin was also used as resistance inducer with the above mentioned 4 methods of induction treatment and proven to be able to induce 100% systemic resistance of tobacco seedlings to brown spot by leaf droplet inoculation method, which was 35—77% higher than that induced by the spore of the same fungal strain.

赤星菌强、弱毒株与烟草互作的功能歧化

刘爱新　董汉松　侯成晓

我们在研究中发现，赤星菌强、弱毒株产生 AT 毒素[1]和引致寄主发病的能力[2]有明显不同，但都可以在寄主叶片上繁殖并穿过叶片在接种点背面长出菌丝，继此之后，强毒株可以引起叶片的特征性坏死斑；而弱毒株并不使寄主产生明显病斑[2]，但当用作诱导因子时，它们可明显诱导烟草对赤星病的系统抗性[3,4]。一般认为，抗性诱导作用必须给予植物一种强烈刺激，例如过敏反应(HR)中的非亲和信号是以接触识别的形式刺激植物[5,6]。

赤星菌弱毒株的上述表现可能包含十分有趣的机制：①它作为诱导因子必须给予寄主一个可传导的信号，才能诱发系统的抗性。系统的诱导抗性虽在其他病害中已多有发现，但诱导因子多数是以可以系统传导的方式，如注射，施加给植物的[7]；②在我们的测定中，弱毒株是以悬滴接种方式诱导烟草的，它是 6 种所测诱导方法中效果最好的一种[4,8]。而在相同条件下，病菌强毒株不具抗性诱导效应或诱导感病性。这就是说，病菌与寄主接触的后果在强、弱毒株中是不同的；③可以假设，强、弱毒株在与寄主接触阶段遵循相同的机制，而这种机制在中止弱毒株与寄主互作关系发展的同时，是以给予寄主一个刺激信号；而强毒株则靠这种机制建立寄生关系；④这种机制必然以寄主、病菌特定物质的参与为基础。本文是对与这种互作功能歧化有关的因子研究的结果(1992—1993 年进行的研究)。

一、材料和方法

1. 菌株

强、弱毒株各 10 个(表 1)，从来自全国各地的菌株中筛选，均已按文献[2]的方法作了致病性测定。

表 1　供试菌株

Table 1　The pathogen strains to be tested

强毒株	弱毒株
TBA 4、28、116、150、156、162、202、203、288、311	TBA 14、15、16、126、136、171、225、233、236、320

2. 烟草品种

选 NC89，培育到 7—9 叶期备用。

3. 胞外酶测定用培养基

(1) 基本培养基(BM)：KNO_3，10g；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$，2. 5g；K_2HPO_4，5g；无离子水，

1000ml；琼脂糖，0.8%(w/v)。

(2) 蛋白酶测定培养基：BM+10%(v/v)脱脂牛奶，牛奶过滤灭菌，另加 300μg/ml 利福平防细菌污染。

(3) 纤维素酶测定培养基：BM+0.25%(w/v)滤纸，滤纸事先搅成匀浆，一同蒸汽灭菌。

(4) 果胶酶培养基：BM+0.25%(w/v)聚半乳糖醛酸(Sigma)，一起蒸汽灭菌。

(5) 几丁质酶培养基：BM+0.25%(w/v)几丁质。几丁质由甲壳素(江苏农学院出品)经以下处理使其可溶：烘干→研碎→2*N* 盐酸热浴→NaOH 溶液中和→对无离子水透析。

4. 酶产生能力测定

从新鲜马铃薯琼脂培养基菌落上移小菌块(约 2×2mm)至各培养基上，25℃±下培养 7 天后检测，每菌株做 4 皿。

5. 产生 AT 毒素的能力

按以前的方法[9]取得毒素分离物，并用烟苗浸根法测定活性，以处理 48 小时(25℃±)引起的病变等级作为毒素活性单位(0—4 单位)。

6. 产生吸附素的能力

选强毒株 TBA28、弱毒株 TBA16，用其孢子悬浮液(10^5 孢子/ml)接种烟苗第 4、5 真叶的上表面，25℃±下 4、6、8、12、16 小时取样，制样后在电镜下观察，吸附素产生能力按其扩散面积和密度加以估计。

7. 孢子吸附能力测定

选强毒株 TBA19、TBA28 和弱毒株 TBA14、TBA16，用其孢子悬浮液(10^4 孢子/ml)接种离体烟叶下表面，每点接液量 25μl，接种点孢子总数为 250 个。接种后 5、10、15、30、60 分钟取样，接种点水洗 3 次后撕下表皮，在显微镜下计测孢子吸附量。

8. 侵染过程观察

对 6 中的处理在接种后 12 和 16 小时、16 和 20 小时分别制成扫描、透射电镜样，检查孢子在表面的行为和菌丝侵入组织的情况。

9. 穿透叶片生长的能力

选强、弱毒菌株各两个，按文献[2]的方法在接种后 72 小时检测穿透生长等级，同时接种烟苗测定病情指数。

二、结　　果

1. 致病因子上的差别

(1) 胞外酶产生能力：从表 2 的结果可知，4 种胞外酶(包括除蛋白酶外的 3 种细胞壁

降解酶,CWDE)在强、弱毒株间无一致差别,哪种酶产生的多少(以生长能力和酶扩散范围计)在所有菌株中大致相似。在培养的早期可以见到明显的酶扩散圈,直径大于微弱生长的菌落直径,但扩散的可见性主要受培养基的均匀性和透明度影响(图 1),例如在果胶酶测定培养基上,酶扩散圈比较明显。

(2) AT 毒素产生能力:总的来看,弱毒株产毒素的能力低于强毒株(表 3),表现有:①强毒株的毒素活性可以达到 4 个单位,但弱毒株最高是 2.1;②供试各 10 个菌株中,强毒株毒素活性单位高于 1.5 的有 6 个菌株,而弱毒株只有 4 个;③有的弱毒株完全不表现毒素活性。

表 2 病菌强、弱毒株产生 4 种胞外酶的情况

Table 2 Ability of the virulent and hypovirulent strains to produce exogenous enzymes

菌 株	菌落直径(mm)				酶扩散直径(mm)*			
	几丁质酶	果胶酶	纤维素酶	蛋白酶	几丁质酶	果胶酶	纤维素酶	蛋白酶
强毒株								
TBA19	7	32	0	41	N	35	N	N
28	21	24	11	25	N	29	N	N
116	0	36	11	38	5	38	N	N
150	0	36	0	36	N	35	N	N
156	10	33	37	50	N	47	N	N
162	0	33	0	45	N	38	N	N
202	0	33	0	46	N	35	N	N
203	14	28	-23	50	N	30	N	N
288	3	40	12	39	N	40	N	N
311	6	22	23	50	N	48	N	N
弱毒株								
TBA14	5	26	33	41	N	28	N	N
15	3	25	28	42	N	27	N	N
16	20	19	31	67	N	22	N	N
126	0	34	0	34	N	38	N	N
136	12	20	25	42	N	23	N	N
171	27	20	30	41	N	22	N	N
225	44	33	39	39	N	37	N	N
233	0	37	14	26	N	40	N	N
236	17	8	10	46	19	9	15	N
320	15	17	32	45	N	20	N	N

* N=No visible diffusion(无可见扩散斑)。

2. 吸附能力的差别

无论是吸附素产生能力(表 4)还是孢子对烟叶表面的吸附量(表 5),在强毒株与弱毒

株间差别并不明显，图像见图 2。

表 3　病菌强、弱毒株产毒素的能力

Table 3　Ability of the pathogen strains to produce AT-toxin

强　毒　株	毒素活性单位	弱　毒　株	毒素活性单位
TBA19	2.1	TBA14	0.5
28	4.0	15	1.2
116	4.0	16	2.1
150	3.1	126	1.6
156	2.6	136	1.5
162	1.3	171	1.5
202	0.7	225	1.2
203	1.6	233	0
288	1.4	236	0.8
311	0.6	320	0.6
平　均	2.1	平　均	1.1

表 4　两个菌株产生吸附素的能力

Table 4　Adhesin production of the pathogen on tobacco leaf surfaces

菌　　株	时间(小时)	吸附素扩散范围(μm)	吸附素密度(相对)*
强毒株	8	1—2	3.0
TBA28	12	0.5—1	4.0
	16	1—2	3.0
弱毒株	12	1—3	4.0
TBA16	16	1—4	3.0

* 分 4 级。

表 5　病菌强、弱毒株对寄主叶面的吸附情况

Table 5　Attachment of spore of the pathogen on tobacco leaves

菌　　株	吸附孢子数(个)					孢子吸附率(%)				
	5*	10	15	30	60	5	10	15	30	60
强毒株										
TBA19	37	73	125	203	215	14.8	29.2	50.0	81.2	86.0
28	42	81	117	224	232	16.8	32.4	46.8	89.6	92.8
弱毒株										
TBA21	33	69	97	185	205	13.2	27.6	38.8	74.0	82.0
233	35	65	105	190	205	14.0	26.0	42.0	76.0	82.0

* 接种后时间(分)。

3. 穿透和侵入能力的差别

（1）孢子在烟叶表面的行为：芽管长出后随机在烟叶表面生长，并随机穿透叶片；从6—8小时开始产生吸附素。这些行为在强、弱毒株间都无明显差别（图2）。

（2）穿透行为：弱毒株在16小时后才开始穿透叶片，而此时强毒株已引起明显的破坏作用（图3）。

（3）在接种点背面的生长：弱毒株可以穿过叶片在接种点背面生长，但能力明显低于强毒株；穿透叶片与导致寄主病斑形成没有必然联系，如菌株TBA16（表6）。

表6 病菌强、弱毒株在接种点背面的生长情况

Table 6 Ability of the pathogen to grow on the opposite leaf surfaces of inoculation sites after penetration

菌 株	生长等级	病情指数
强毒株		
TBA19	3.5	65
28	4.0	90
弱毒株		
TBA14	1.5	30
16	1.5	0

三、结论与讨论

1. 结论

有3点：①强、弱毒株与烟草互作的分化发生在接触之后穿透之前，就所测菌株而言是在接种后16小时左右；②互作分化前强、弱毒株与寄主的互作在表面行为、孢子和芽管吸附、吸附素产生能力等方面无明显差别；③单从互作的发展看，互作功能歧化的指示是强毒株迅速发生致病作用，最终表型是特征性坏死斑的形成，而弱毒株仅穿透作用至早与强毒株对细胞壁的破坏同时，最终虽能穿透叶片并在接触点背面生长，但并不引起特征性坏死斑的形成或病斑很小（参见文献[2]、[4]）。

2. 引导的进一步研究

在此强调3点：①根据已有的研究结果[1,3,4]，弱毒株中止或弱化正常互作而诱导烟草抗病性，是互作功能分化的一个重要作用；②吸附素类在表面分子互作中起作用的物质具有激发子潜能，并且可能在强、弱毒株间有所分化；③除了毒素的作用外，强毒株CWDE及其扩散能力（如菌株TBA156，图1），可能是致病力强、弱的一个重要因素。

参 考 文 献

［1］王智发、董汉松，烟草赤星病菌致病力-生长产孢关系及不同接种体组分的作用，见：中国烟草学会第二次会员代

表大会会刊，1992，65－73。

[2] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力测定方法的研究，山东农业大学学报，1989，**20**(4)：1－8。

[3] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力分化与弱毒株抗性诱导作用的研究，植物保护学报，1992，**19**：87－91。

[4] 董汉松、于建立，赤星菌弱毒株 TBA16 对烟草抗赤星病诱导作用条件的研究，植物保护学报，1993，**20**：129－134。

[5] 董汉松，病原细菌对寄主植物吸附的生物学，烟台师范学院学报(自然科学版)，1991，**7**(2)：66－73。

[6] Kuc, J., Plant immunization and its application for disease control. In Innovative Approaches to Plant Disease Control (Chet, I. ed.). New York: John Wiley & Sons, 1987, 255－274.

[7] Madamanchi, N. R., Kuc, J., Induced systemic resistance in plants. In The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals (Cole, G. T., Hoch, H. C., eds.). New York: Plenum Press, 1991, 347－362.

[8] 董汉松、于建立、卜晓东、尹东升、孙立松，三类因子在烟草抗赤星病诱导中的作用，山东科学，1993，**6**(2)：47－52。

[9] 董汉松、曲建军、王智发、王少杰、刘广玉、杨合同，赤星菌毒素对烟草幼苗致病特性的研究，山东科学，1993，**6**(2)：39－46。

FUNCTION DIVERGENCE OF HOST-PATHOGEN INTERACTIONS BY VIRULENT AND HYPOVIRULENT STRAINS OF THE PATHOGEN IN TOBACCO BROWN SPOT

Liu Aixin, Dong Hansong and Hou Chengxiao

The functional divergence of the host-pathogen interactions in tobacco brown spot was studied with each 10 strains of virulent and hypovirulent strains of *Alternaria alternata*. The tests followed the stage and functional factors of the interactions. In the contact stage, attachment and adhesin production of spores and their germtube were observed. Then diffusible enzymes, including proteases, chitinases, pectinases and cellulases, and activity of AT-toxin were examined as the pathogenicity factors. The coming properties were penetration behaviors and ability of inducing the characterized symptom.

Three aspects of conclusive results were obtained as follows: ①the functional divergence occurred after the contact and before the penetration stages; ②then the virulent strains continue to complete the pathogenicity process, while the hypovirulent ones can give the host a stimulation to induce resistance against brown spot; ③attachment of spores and adhesin production of germinating and growing germtubes were critical for the interactions and their divergence between the virulent and hypovirulent strains.

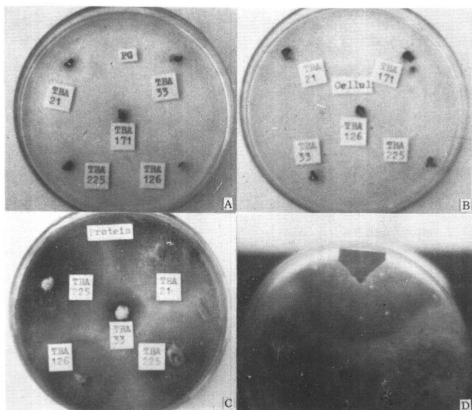


图 1　5 个菌株在酶测定培养基上生长和产生酶扩散圈的情况

Fig. 1　Growth and enzyme diffusion of *Alternaria alternata* strains on the enzyme-testing media

A. 几丁质酶(5 个菌株)；B. 纤维素酶(5 个菌株)；

C. 蛋白质酶(5 个菌株)；D. 果胶酶(TBA156)。

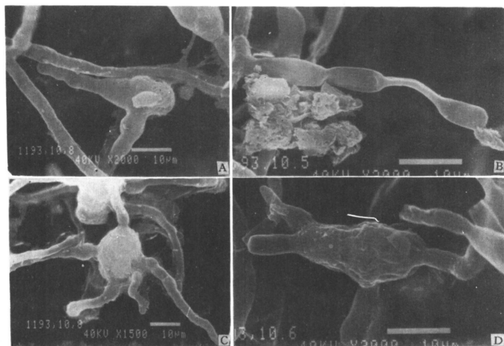


图 2 两个菌株在烟叶表面萌发和产生吸附素的情况(左:TBA28;右:TBA16)

Fig 2 Germtube growth and adhesin production of virulent strain TBA28(left) and hypovirulent TBA16(right) of *A. alternata* on tobacco leaf surfaces

A. 12 小时;B. 12 小时;C. 16 小时;D. 16 小时。

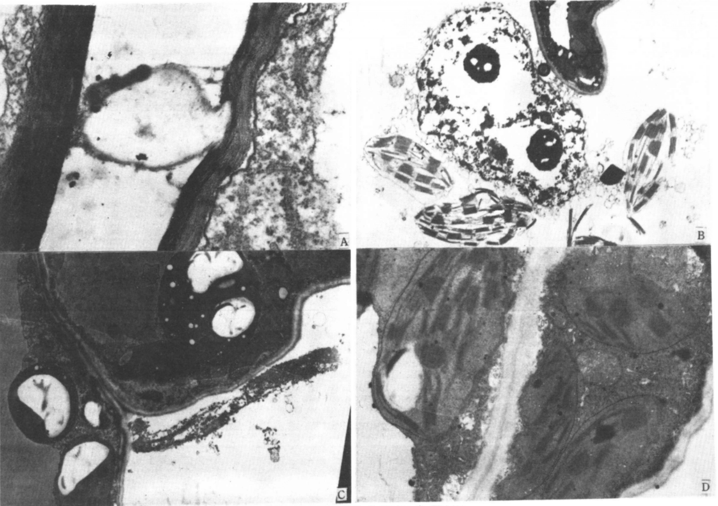


图3 两个菌株对烟叶的侵染情况(左:TBA16;右:TBA28)

Fig 3 Infection and pathogenicity of hypovirulent [TBA16(left) and virulent TBA28(right) of *A. alternata* to tobacco]

A. 16 小时时叶面上的芽管(×4000); B. 16 小时寄主细胞壁被降解(×10000);

C. 20 小时菌丝侵入(×15000); D. 20 小时寄主原生质体被破坏(×7000)。

接触识别导误与烟草抗赤星病诱导的关系

董汉松　刘爱新

在病原真菌-寄主植物互作[1]过程中，不同真菌有3个阶段必须与植物表面接触[2]：孢子吸附、孢子萌发后的芽管在植物表面生长、从气孔侵入的病原真菌穿过气孔下室；在这3个阶段可以发生分别以孢子凝集素、芽管向触性生长、病菌特异性粘联物（如锈菌侵染中气孔副卫细胞和气孔膜表面产生的糖蛋白）或阻止病菌非亲和小种侵染的木质素与乳突的形成等为生化基础的接触识别，由它引发一方或双方的一系列反应并最终导致植物反应表型，即发病（亲和性互作[1]）或发生防卫反应（非亲和性互作[1]）。在此过程中，病原物看起来起主要作用，例如，植物对细菌的过敏反应是由细菌 *avr*（无毒）或 *hrp*（过敏反应和致病性）基因产物诱发的[4]；真菌的寄主专化性毒素（HST）是以一种配体分子的功能与寄主植物受体分子发生分子识别而引起寄主一系列的细胞和组织反应[2]。这种现象部分地是因为病原物（尤其是细菌）基因组简单、易于用分子生物学和分子遗传学方法加以研究，但同时说明从病原物一方更便于了解互作的机制，这也是目前关于植物-病原物互作研究的大致状况[1,5]。

以此来看赤星交链孢（*Alternaria alternata*，赤星菌）与寄主（烟草）的相互作用，前人的研究很少注意到病菌侵染前行为的病理学意义，而更多地把视点先是放在细胞壁降解酶上、后是放在AT毒素作为致病因子的作用（这是由接触后识别导致寄主发病的过程）上[6]。这无论对了解病菌的致病机制，还是对研究和利用寄主的抗病性都是一个缺陷。AT毒素作为致病因子的作用使人们能够利用植物体细胞无性系变异（SV）途径改造抗病性；而接触识别的导误[9]与病菌弱毒株对烟草抗赤星病诱导作用有密切关系，这是自董汉松等[7,8]报道赤星交链孢弱毒株可以诱导烟草对赤星病的系统抗性以来所提出的问题，本文是这方面的初步研究结果（1993—1994年进行的研究）。

一、材料和方法

1. 材料

（1）赤星交链孢菌株：TBA28致病力强[10]，用于对诱导的烟草植株作挑战接种和观察在烟叶表面的侵染前行为，TBA16是弱毒株[10]，用作诱导因子。

（2）寄主材料：所用烤烟品种是NC89，种子由山东农业大学烟草研究室繁殖保存。

（3）细菌菌株：非病原细菌 *Pseudomonas fluorescens* P1原从番茄叶面分离，接种烟草叶面定殖、再分离后使用。

（4）病毒N14：是番茄条斑病毒的弱株系，由中国科学院微生物研究所提供，液体毒样在4℃下保存。

2. 诱导因子制备

（1）赤星交链孢孢子和孢子壁组分：TBA16 的孢子（10^5±/ml）悬浮液依文献[10]的方法制备；孢子壁组分为壁的粉碎物（0.1—1.0um），含量为 50mg/ml。

（2）细菌因子：有完整菌体和不含 LPS 的菌体（10^8±cfu/ml），脂多糖（LPS）和胞外多糖（EPS，均 $8\mu g/ml$），都按文献[11]的方法制备。

（3）病毒汁液：先把 N14 接种到烟草上繁殖，使用时取毒源叶片研磨（pH7.2 的磷酸缓冲液）。

3. 诱导抗性测定方法

当烟苗长到 7—9 叶期，用病毒 N14 汁液摩擦接种心叶；用其它诱导因子悬滴接种第 3、4 真叶，16—25℃下到第 12 天用赤星交链孢菌株 TBA28 孢子（10^5±/ml）以悬滴法挑战接种第 5、6 真叶，以不经诱导的烟苗同样接种为对照，诱发赤星病后计测病斑面积，抗性诱导效应表示为病斑面积减少的百分数。具体方法依文献[10]，每诱导-挑战组合各处理 6 株烟苗，统计结果取平均值。

4. 病菌侵染前行为观察

在烟草诱导处理后第 15 天，用菌株 TBA28 的孢子悬浮液悬滴接种诱导和未诱导烟草的第 5、6 真叶，25℃±下定期（6、8、12、16 小时）从接种点取叶片（约 3×3mm）制成扫描电镜样本[12]，用 JEM-12000EX 透射电镜扫描附件观察。

二、结　　果

1. 导误类型

表 1 列出了赤星病菌被诱导的侵染前行为失误的 7 种类型，分别由非病原细菌、病毒、赤星菌弱毒株预先诱导处理烟草引起。每种诱导因子可导致不同的失误类型，其中弱毒株能引起所有类型的失误。

2. 赤星菌致病力的诱导降低（表型）

当用 3 类微生物预先诱导处理烟草后，赤星菌在非诱导叶叶面上的侵染前行为失误与致病力降低有密切关系，表现为赤星病减轻（烟草诱导抗性）55—94%。

三、讨　　论

对赤星菌侵染前行为的导误与致病力降低，即与烟草抗赤星病诱导的关系以前少有人注意。一般地说，植物诱导抗性的发生包括组织、细胞、生化和分子水平的不同机制[13]；在组织和细胞水平上，植物防卫反应是抗性增强的主要原因，其中包括对病菌侵染前行为失误的诱导[14]。本文表明这与病菌致病力减弱，或烟草诱导抗性的发生，有密切关系。虽然还很难确定这种导误在植物抗病性诱导中所占的比重有多大，但已有用它来防治病害

的设想或实际例子[15]。

表 1 3类微生物诱导烟草引起的赤星菌侵染前行为失误

Table 1 Mistakes in preinfection behaviors of *Alternaria alternata* on leaves of tobacco induced by bacteria, virus, and the hypovirulent pathogen

失误类型	诱导因子
1. 孢子萌发延迟(图 2—4)	细菌，病毒，赤星病弱毒株
2. 持续产孢(图 2,A)	细菌
3. 孢子、芽管不产生粘联物质或产生量减少(图 2—4)	细菌，病毒，弱毒株
4. 芽管背离叶面生长(图 4,E)	弱毒株
5. 芽管顶端膨大，不能侵染或侵染能力降低(图 2—4)	细菌，病毒，弱毒株
6. 芽管盘吸在叶面但不侵染或侵染能力降低(图 4,D)	弱毒株
7. 芽管弯曲生长(图 4,H)、顶部液泡化(图 4,F)或原生质流空(图 3,B)	弱毒株，弱毒株，病毒
正常发展(在未诱导的烟草叶面上，图 1)：孢子在 4—6 小时内萌发，6—8 小时开始产生粘联物，芽管沿叶面生长，12 小时后随机侵入，顶端不膨大。	

表 2 赤星菌在诱导处理的烟草上致病力减弱的情况

Table 2 *Alternaria alternata* pathogenicity reduction caused by bacteria, virus, and the hypovirulent pathogen as resistance inducers of tobacco to brown spot

诱导因子	挑战后病斑面积 (mm^2)	病斑面积降低 (%)
细菌 P1	3.1	94.4
CK	55.0	
TBA16	7.8	55.4
CK	17.5	
病毒 N14	5.8	83.7
CK	35.6	

赤星菌侵染前行为的 7 类失误显然是诱导因子给予烟草的刺激在烟草植株内传导的结果，这被认为是一种信号传递[14]。从植物-病原物互作看，侵染前行为导误是一种接触识别[2]导误，包括已知和未知的不同机制。孢子和芽管粘联物(adhesin)产生能力的减弱或丧失，说明接触识别的生化基础受到影响。这种 adhesin 在毒性菌株中为侵染所必需，在弱毒株或无毒株(被用作抗病性诱导因子时)中可以作为烟草抗病性诱导的激发子(elicitor)起作用，这是一种"激发子-植物反应-病菌行为失误"的链反应[2,9]。对其他类型的导误还只能根据植物-真菌互作的一般规律来解释：芽管背离叶片或弯曲生长及芽管顶端膨大(都导致致病力减弱或丧失)是病菌向性生长(tropism)失误的表现，这是由植物表面结构和特定生化因子变化引起的[2]；另几种导误，如孢子萌发延迟，更可能因为烟草给予赤星病某种生化刺激的作用[16]。对此种种，尚在研究。

参 考 文 献

[1] 王金生，农业生物技术进展与展望(贾士荣主编)，中国科学技术大学出版社，1993，55—64。

[2] 董汉松，农业生物技术进展与展望(贾士荣主编)，中国科学技术大学出版社，1993，65 79。
[3] 董汉松，烟台师范学院学报(自然科学版)，1991，**7**(2)：62 67。
[4] 马庆生，农业生物技术进展与展望(贾士荣主编)，中国科学技术大学出版社，1993，87 96。
[5] Gabriel，D. W.，Rolfe，B. G.，Annu. Rev. Phytopathol.，1990 **28**：365—391.
[6] 董汉松等，山东省自然科学研究进展，中国科学技术出版社，1993，122—128。
[7] Dong，H. S. et al.，CORESTA Inf. Bull.，CORESTA Symp. Greece，1990，84.
[8] 董汉松等，植物保护学报，1993，**20**：129 134。
[9] 董汉松等，山东科学，1993，**6**(2)：1 9。
[10] 董汉松等，植物保护学报，1992，**19**：87 91。
[11] 董汉松等，微生物学报，1993，**33**：144 150。
[12] 黄 立，电子显微镜生物样品制作技术，江苏科学技术出版社，1982。
[13] 董汉松，植物抗性生理研究(赵可夫主编)，山东科学技术出版社，1992，193 201。
[14] Madamanchi，N. R.，Kuc，J.，In The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals (Cole，G. T.，Hoch，H. C.，eds.)，Plenum Press，1992，347—362.
[15] Wynn，W. K.，Ann. Rev. Phytopathol.，1981，**19**：237—255.
[16] Nicholson，P. L.，Epstein，L.，In The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals (Cole，G. T.，Hoch，H. C.，eds.)，Plenum Press，1992，3—24.

INDUCTION OF MISTAKES OF CONTACT RECOGNITION AS RELATED TO THE INDUCED HOST RESISTANCE IN TOBACCO BROWN SPOT

Dong Hansong and Liu Aixin

On leaf surfaces of tobacco which had been pretreated respectively with non-pathogenic bacteria，virus，and hypovirulent strains of brown spot pathogen (*Alternaria alternata*)，virulent strain of *A. alternata* showed 7 types of mistakes of preinfection behaviors：①delayed germination of spore；②continuous sporulation；③reduced or defective production of adhesin；④germtube growth away from leaf surfaces；⑤swollen tip part of germtube with defective or reduced infection；⑥tight anchoring of germtube on leaf surfaces，with defective or reduced infection，and ⑦zigzag germtube，or with vasculated or emptied tip part. The induced mistakes were correlated to decrease in pathogenicity of the pathogen，indicating by 55—94% reduction of brown spot in the induced tobacco. It was suggested that the above mistake induction is the expression of mistake induction of the host-pathogen contact recognition and contributes to induced resistance of tobacco to brown spot.

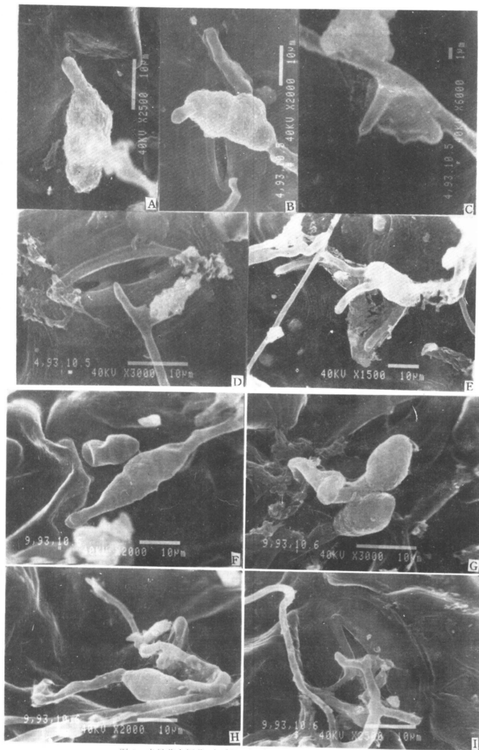


图1　赤星菌在烟草(未诱导)叶面上的正常行为过程(A　E)
Fig. 1　Formal development of *Alternaria alternata* on leaf surfaces of uninduced tabacco(A　E)
A. 6 小时；B. 8 小时；C—E. 12 小时；F. 12 小时；G—I. 16 小时。

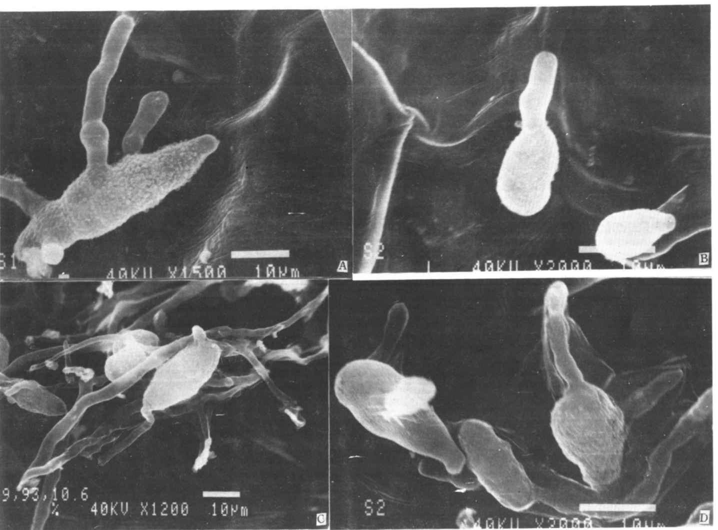


图2　赤星菌在经细菌诱导的烟草叶面上的行为变化

Fig. 2　The fungal behaviors on leaf surfaces of tobacco previously (15 days before) induced with bacteria

A. 8 小时；B. 12 小时；C、D. 16 小时。

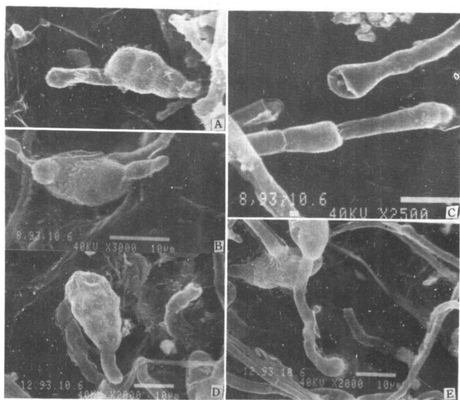


图 3 赤星菌在经病毒诱导的烟草叶面上的行为变化

Fig. 3 The fungal behaviors on leaf surfaces of tobacco previously induced with virus

A. 192 小时(×2500);B. 12 小时;C－E. 16 小时。

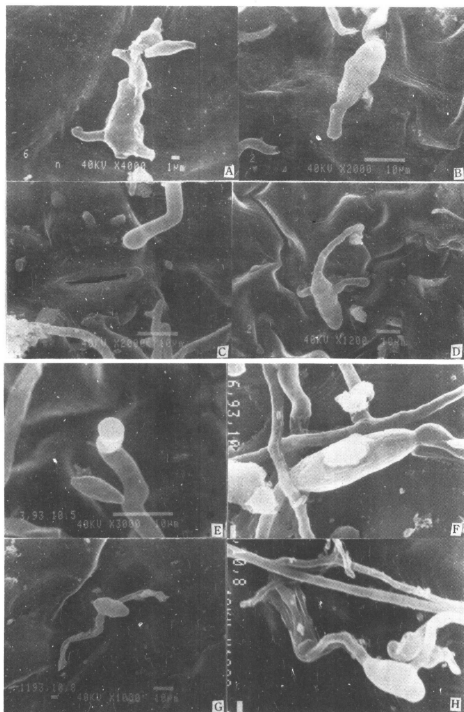


图 4 赤星菌在经其弱毒株诱导的烟草叶面上的行为变化(A—D)
Fig. 4 The fungal behaviors on leaf surfaces of tobacco previously induced with hypovirulent strain of the pathogen(A—D)
A. 6 小时;B—D. 8 小时;E.F. 12 小时;G、H. 16 小时。

病菌弱毒株和非病原细菌诱导烟草抗赤星病生化基础的研究

刘爱新　董汉松　高明友　曹常余　孙运达　张成喜

按照植物抗病性在组织上从外到内的层次机制[1]，抗性诱导引起的植物反应首先在寄主-病原物接触识别(表面互作)阶段表现出来[2]。这是一个由诱导因子或其特定组分(当为生物因子时)与植物表面特定物质(预存性或诱导性)相互作用的过程。植物诱导产生的有一定病理学作用的物质常有共同性：木质素的诱导合成与乳突的形成、几丁质的诱导合成等都有抗真菌侵染的功能[3]；富羟糖蛋白、外源凝集素、细菌凝集素的诱导合成(也有预存的)主要与对细菌的非亲和性识别有关[4]。但作为诱导因子的微生物对以上各种反应的诱导有不同的生化基础，主要与这类微生物的表面特性有关。在烟草赤星病中，这方面的研究仍是空白(参见文献[5,6])，本文以病菌弱毒株和非病原细菌为诱导因子初步作了有关测定(1992—1993 年进行的研究)。

一、材料和方法

1. 材料

(1) 烟草品种和赤星菌菌株：所用烤烟品种是 NC89，种子由山东农业大学烟草研究室繁殖保存。挑战接种和侵染前行为观察用赤星菌(*Alternaria alternata*)强毒株 TBA28，作为诱导因子的病菌弱毒株为 TBA16。

(2) 细菌：所用菌株是 *Pseudomonas fluorescens* P1，从番茄叶面分离并可在烟叶表面定殖。

2. 诱导因子制备

(1) 病菌孢子及其组分：有 3 种：①完整孢子，依文献[7]的方法制备，诱导接种量为 10^5 土孢子/ml；②部分破碎的孢子壁，是把孢子经超声波细胞粉碎器(JY88—Ⅱ型)破碎、离心沉淀(4 000r/min)制成，诱导接种浓度为湿重 0.5g/ml；③孢子壁破碎物按特定方法制成(保密)，粒度为 0.1—1.0μmϕ，诱导接种浓度为干重 0.05g/ml。

(2) AT 毒素：按文献[8]的方法制备，用粗毒素原液作诱导处理。

(3) 细菌 P1 及其组分：包括：活菌体、热杀死菌体、洗去 LPS(和 EPS)的菌体，诱导接种液含菌量都是 10^8±cfu/ml；菌体 LPS 和 EPS，诱导接种液浓度约 8μg/ml。3 种菌体、2 种多糖均按文献[9]的方法制备。

3. 诱导抗性测定方法

当 NC89 苗长到 7—9 叶期，用以上各类因子悬滴接种第 3、4 真叶，16—25℃下到第

12 天用 TBA28 的孢子(10^{4}—10^{5}/ml)悬浮液悬滴挑战第 5—8 真叶中邻近的两片成长早、长势一致的叶片，诱发病害后计测病斑面积，抗性诱导效应表示为病斑面积减小或发病位点减少的百分数。具体方法依文献[7]。每种诱导因子各处理 6—12 棵苗，同批处理用不诱导但同样挑战接种的 6 棵烟草为对照；统计结果取平均值。

4. 病菌在叶面行为的观察

烟草诱导处理后第 15 天，用赤星菌强毒株 TBA28 的孢子悬浮液接种诱导叶之上的 2 片叶，25℃±下隔 6、8、12、16 小时取样制成扫描电镜样品[10]，用 JEM-1200EX 型扫描电镜观察。

二、结　　果

1. 病菌不同组分的抗性诱导作用

从表 1 看出，弱毒株 TBA16 的 3 种结构组分能明显地诱导烟草对赤星病的抗性，抗性诱导效应大小与孢子壁破碎程度呈正相关关系。强毒株 TBA28 的完整孢子强烈增强自身侵染的程度(诱导烟草感病性)，部分破碎的孢子壁显示较低的抗性诱导效应；但它产生的 AT 毒素表现出很强的作用，使烟苗呈"免疫"状态。有一点值得注意，这些成分诱导的抗病性都是系统性的。

表 1　病菌孢子不同组分及 AT 毒素诱导烟草抗赤星病的情况

Table 1　Tobacco resistance to brown spot induced by different components of the pathogen strains

诱导因子		挑战接种后病情[1]		抗性诱导效应(%)	
菌株	成分[2]	DSR[3]	SP[3]	DDSR[3]	DSP[3]
TBA16	完整孢子(ES)	70.33	43.0	27.71	55.67
(弱毒株)	CK	98.04	97.0		
	部分破碎(PS)	43.60	43.5	28.27	51.50
	孢子壁粉(BW)	24.73	9.9	59.43	88.96
	CK	60.95	89.7		
TBA28	ES	100	194.2		−123.71
(强毒株)	CK	100	86.9		
	PS	100	74.0		23.71
	CK	98.04	97.0		
	毒素	0	0	100	100
	CK	100	490.6		

①第 12 天挑战。②ES＝杀死的孢子；PS＝部分破碎的孢子；BW＝孢子壁粉；③DSR＝发病位点(%)；SP－病斑直径(mm)；DDSR、DSP－DSR、SP 减弱。

2. 细菌及不同组分的抗性诱导作用

表 2 说明，非病原细菌抗赤星病诱导作用与菌体死活无关，而主要取决于 LPS 和

EPS。

表 2 细菌 P1 菌体和菌体多糖的抗赤星病诱导效果

Table 2 Tobacco resistance to brown spot induced by different components of *Pseudomonas fluorescens* P1(nonpathogenic)

细菌组分	挑战接种后病斑面积(mm^2)	病斑面积减小(%)
活菌体	0.99	95.57
死菌体	1.35	93.95
无 LPS 的菌体	31.92	-42.88
脂多糖(LPS)	0.44	98.10
胞外多糖(EPS)	1.11	95.04
对　照	22.34	

3. 抗性诱导引起的病菌侵染前行为变化

赤星菌强毒株 TBA28 在诱导过的植株叶面上(图 2、图 3)与在未经诱导的植株叶片上(图 1)相比,侵染前的早期行为有 3 种主要变化:①孢子萌发能力和芽管生长能力明显降低,表现为萌发时间推迟、芽管生长慢,细菌和赤星菌弱毒株都能诱导这种变化;②芽管生长方向改变,背叶面方向生长,主要为弱毒株所诱导;③芽管不产生粘联物质(弱毒株诱导),或产生粘联物质的时间晚、量少(细菌诱导)。应该指出,芽管粘联物质的产生是很明显的(对照中)。

三、讨　论

从细菌 P1 和赤星菌弱毒株 TAB16 不同组分对烟草抗赤星病的诱导效果看,细胞壁成分是这种抗性诱导作用的生化基础,它们通过与烟草叶面的接触识别[12]诱导抗病性。不同组分的作用对从接触识别出发研究诱导抗性的机制有不同的意义。①病菌孢子壁破碎物的作用特点提示了具有抗性诱导激发子(elicitor)功能的物质的存在,这种假设的物质表现双重作用:使病菌弱毒株获得抗性诱导能力,并在无需侵入寄主的条件下诱导抗病性[11];也可能是病菌强毒株侵染前与寄主表面接触的媒介,芽管产生粘联物便说明了这一点。②细菌 LPS 是几乎所有植物-细菌接触识别中的细菌识别子(cognon)[12],显然也是诱导烟草抗病性的物质基础;EPS 的作用不好解释(EPS 更多地不是作为 cognon,而是作为 LPS 的掩盖物起作用[10]),但至少说明烟草抗赤星病诱导可以包括非抗原性物质的作用,如果是专化的,它就相当于植物"受体分子"的一个特异性半抗原(hapten)[12]。③AT 毒素的作用是通过细胞膜的[10],这成为通过体细胞无性系变异(SV)途径诱导抗病性的根据。对以上种种,作者已有另文报道或在以后继续报道。

从病菌在烟草叶面上的行为看,寄主细胞壁上的变化也显然是影响病菌侵染前行为异常的因子[1,2,12];芽管产粘联物质能力的减弱或丧失、异向生长、孢子萌发能力降低,分别暗示寄主某种刺激物、向触性信号、抑制物的作用,对此有必要深入研究。

参 考 文 献

[1] Verma, D. P. S., Molecular Signals in Plant-Microbe Communications. Boca Raton, Ann Arbor, London: CRC Press, 1992, 65—84, 407—422.

[2] Cole, G. T., Hoch, H. C., The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. New York, London: Plenum Press, 1992, 347—362.

[3] 王金生,植物病理学报,1991,**22**:228—232。

[4] Chet, I., Innovative Approaches to Plant Disease Control. New York: A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, 1983, 225-274.

[5] 董汉松,植物抗性生理研究(赵可夫主编),济南:山东科学技术出版社,1992,193—201。

[6] 董汉松等,植物保护学报,1992,**19**:87—91。

[7] 董汉松等,山东科学,1993,**6**(2):39—46。

[8] 董汉松等,微生物学报,1993,**33**:144—150。

[9] 黄　立,电子显微镜生物标本制备技术,南京:江苏科学技术出版社,1982。

[10] 董汉松,农业生物技术进展与展望　国家863计划生物技术领域第一主题学术研讨会论文选编'92(贾士荣主编),合肥:中国科学技术大学出版社,1993,65—79。

[11] 董汉松、于建立,植物保护学报,1993,**20**:129—134。

[12] 董汉松,植物生理学通讯,1991,**27**:391—396。

CELL WALL COMPONENTS OF NONPATHOGENIC BACTERIA AND HYPOVIRULENT *ALTERNARIA ALTERNATA* ARE RESPONSIBLE FOR INDUCTION OF TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT

Liu Aixin, Dong Hansong, Gao Mingyou,
Cao Changyu, Sun Yunda and Zhang Chengxi

Different components of cell wall of nonpathogenic *Pseudomonas fluorescens* P1 and hypovirulent TBA16 of *Alternaria alternata* were tested for function of inducing tobacco resistance to brown spot. Behaviors of virulent strain TBA28 of the pathogen on leaf surfaces of tobacco were observed by SEM, to know what alternation of prepenetration of the pathogen to the plant was caused by the resistance induction. The powder cell wall in 0.1—1.0um size of the TAB16 spores showed 89% resistance inductory effect, which was 52% and 56% higher than that showed by partly broken-down cell wall (BW) and entire spore (ES) of the hypovirulent strain. Neither the BW nor ES of the virulent TBA28 gave evident resistance induction, but the AT-toxin produced by the virulent strain induced 100% resistance of the plant to infection of the TBA28 spores. The bacteria P1 was able to induce 94% and 96% resistance when using the alive and heat-killed cells, while induce 43% susceptibility when using the LPS-free cells. LPS

and EPS of the P1 were purified and used as the inducers, and gave over 95% resistance inductory function. The virulent TBA28 showed 3 types of alternation in the early prepenetrating actions on tobacco leaf surfaces caused by the plant induction by both the TBA16 spore and P1 bacteria: (a) reduced ability of the spore germination and its tube growth; (b) changed direction, away from leaf surfaces, of the tube extension, and (c) weakened or defective capability of the tube to produce the unidentified adhesin-like materials. The continuous studies have been focused on the biochemistry and function in an elicitor form of the adhesin.

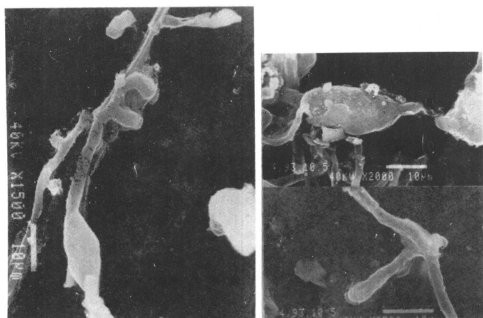


图 1　赤星菌强毒株 TBA28 在未诱导烟株叶面上的行为(左:8 小时　右:12 小时)

Fig. 1　The early behaviors of virulent TBA28 of *Alternaria alternata* on leaf surface of tobacco uninduced (Left: 8h; Right: 12h.)

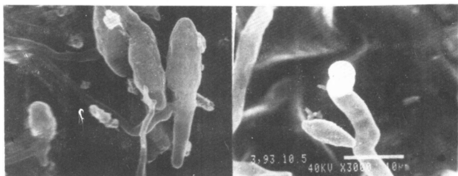


图2 病菌 TBA28 在弱毒株孢子诱导的烟株叶面上的行为(左:8小时; 右:12小时)

Fig. 2 The early behaviors of the virulent TBA28 on leaf surface of tobacco induced by spores of hypovirulent TBA16 of the pathogen. (Left: 8h; Right: 12h.)

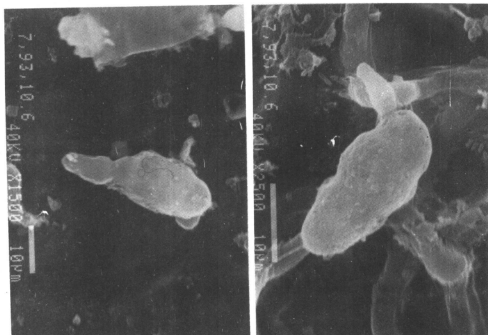


图3 病菌 TBA28 在细菌 P1 诱导的烟株叶面上的行为(左:8小时; 右:12小时)

Fig. 3 The early behaviors of the virulent TBA28 on leaf surfaces of tobacco induced by nonpathogenic *Pseudomonas fluorescens* P1 (Left: 8h; Right: 12h.)

三类生物来源的激发子(elicitor)对烟草抗赤星病的诱导作用

董汉松　刘爱新　王少华

根据已有的研究，赤星菌强、弱毒株与烟草的相互作用在接触阶段之后发生分化，弱毒株不能继续建立致病作用的进程，但对烟草叶面的接触和微弱穿透可给予寄主一个有效刺激，使其产生对赤星病的系统抗性[1]。按照吸附素和细胞壁结合分子可以作为激发子起作用的假设，以这种激发子粗制物为功能成分的两类制剂(PCF1[2]和 SRS2)在田间应用中显示对赤星病的控制作用。另一方面，强毒株虽也有产生吸附素的能力，但它们在室内测定中多不显示明显的抗性诱导效应，相反，不少强毒株用作诱导因子时诱导的是感病性。关于激发子的研究除想寻找这方面的原因外，还有关于抗性诱导机制探讨的多方面考虑，本文是这项研究的初步结果(1993 年进行的研究)。

一、材料和方法

1. 烟草

用品种 NC89，培育到 11—13 叶期使用。

2. 赤星菌株

强毒株是 TBA28，弱毒株是 TBA16，前者除用作挑战接种外，还与后者一起用来提取激发子。

3. 激发子制备

(1) 细胞壁结合态激发子(BE)：从菌株 TBA16 和 TBA28 制备，大致程序是：PDA 培养液长 2 周，25℃±→抽滤取孢子和菌丝→去离子水和磷酸缓冲液(pH7.2，0.2mol/L)各洗 3 次→超声波破碎(在 JY88-Ⅱ型机上，间歇式 30 分钟)→对去离子水透析(48 小时)→截留部分备用。

(2) 孢子萌发和菌丝生长中的扩散物质(DE)：也用两个菌株制备，过程是：PDA 平板培养 2 周(25℃±)→无菌水中生长 3 天→离心(3 000r/min，10 分钟)取上清液→对水透析 24 小时→截留部分备用。

(3) 果胶降解物(PG)：果胶(Sigma)从桔皮提纯，由它制备激发子：酸解(2N 盐酸，热浴 10 分钟)→中和→透析(48 小时)→截留部分备用。

4. 诱导处理

烟苗在使用前 3 天摘除底叶、留上部整齐一致的 6 片叶，在倒数第 3、第 5 叶上作诱

导处理：于中脉上注射 0.5ml、在其两侧注射渗入 0.5ml；使用浓度为：BE，1%（w/v，细胞壁鲜重）；DE，透析截留原液；PG，2%（w/v）。以注射灭菌水为对照。诱导后在 16－23℃±放置到第 3 天，取样测定病程相关蛋白（PRP），第 6 天挑战接种。每种激发子处理 4 棵烟苗。

5. PRP 电泳

定量取样，以不作任何处理为对照，所得胞间液的体积相当于胞间全部体积。

6. 挑战接种与诱导抗性检测

依文献[3]的方法。

二、结　　果

1. 激发子诱导的抗病性

表 1 是测定结果：PG 无作用，强、弱毒株的两种激发子效果明显，以 BE 好于 DE，又以强毒株的激发子好于弱毒株的同类激发子。

2. 激发子诱导 PRP 的情况

所有因子诱发的 PRP 共有 10 种（电泳带，图 1），种类上因激发子的差别是：①病菌的 BE 可诱导 6b-1 产生，而 DE 则不能；②只有 PG 可以诱发 b3，而 PG 不具抗赤星病诱导作用。不同因子间的差别还表现在它们诱导不同 PRP 量的多少上，因为 PRP 是按一致的胞间体积定量的，所以电泳带的深浅可以反映这种差别。

表 1　激发子诱导烟草抗赤星病的情况

Table 1　Effects of different elicitors to induce tobacco resistance to brown spot

激　发　子	来　　源	挑战后病斑直径(mm)	抗性诱导效应(%)
BE	TBA16	17.3	49.42
	TBA28	16.3	52.49
DE	TBA16	21.3	37.87
	TBA28	19.8	42.11
PG	桔皮	35.6	－4.09
CK		34.2	

* BE＝细胞壁结合态激发子；DE＝扩散态激发子；　PG＝聚半乳糖醛酸(Sigma)的酸解产物。

三、讨　　论

几种激发子诱导烟草抗赤星病的能力与诱导烟草 PRP 产生和积累的能力之间有一定的对应关系，这种关系因病菌激发子的形态不同而不同，可以反映在 PRP 的种类和量上。从植物接受刺激信号的特异性（特定基因的反应元件）出发，此现象是一个很好的表型。另一些值得探讨的问题是：①强毒株本身无抗性诱导作用，但它的两类激发子却显示明显的效果；②结合态激发子的作用强于扩散态；表明接触刺激对诱导烟草抗赤星病更有

效，这与我们以前的一些设想相吻合，如接触识别是参与抗赤星病诱导的机制之一，但对接触刺激如何把信号传达到某件反应元件，还是一个有待研究的课题；③这需要首先明确激发子的性质及与寄主受体识别的机制。最后，从实用目的出发，抗病诱导剂的制备可从弱毒株转向强毒株，但需要了解不同的强毒株是否都有像 TBA28 一样的表现。

参考文献

[1] 董汉松、于建立，赤星菌弱毒株 TBA16 对烟草抗赤星病诱导作用条件的研究，植物保护学报，1993，**20**：129—134。

[2] 董汉松、刘爱新、孙晓平、卜晓东、王兴利、杨献营，赤星菌弱毒株孢子制剂 PCF1 对烟草赤星病的控制作用，植物保护学报，1994，**21**：255—260。

[3] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力分化与弱毒株抗性诱导作用的研究，植物保护学报，1992，**19**：87—91。

ELICITATION OF TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT BY THREE KINDS OF BIOTIC ELICITORS

Dong Hansong, Liu Aixin and Wang Shaohua

The cell wall-bound elicitor (BE) and diffusible elicitor (DE) were prepared from virulent strain TBA28 and hypovirulent strain TBA16 of *Alternaria alternata*, and induced 38—52% enhancement of tobacco resistance to brown spot. The third elicitor was obtained by acidic lysis of orange pectin and showed no role of resistance induction. Ability of the three elicitors to induce occurrence and accumulation of PR proteins in tobacco cv NC89(flue-cured)were also tested.

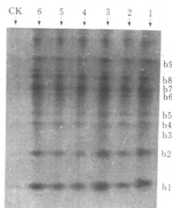


图 1 激发子诱导 PRP 的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis picture of PR proteins induced by different elicitors

诱导因子：1. 注射清水；2. TBA16，BE；3. TBA16，DE；4. TBA28，BE；5. TBA28，DE；6. PG；CK（不处理）。

抗赤星病诱导中
烟草病程相关蛋白(PRP)的发生及动态

董汉松　王少华　刘爱新　郑继法

总的来看，明确各类PRP的功能，了解它们的遗传运作机制并由此了解诱导抗性的遗传运作机制，还是一个尚未完成的任务。在烟草上，对NN(nn)型香料烟抗花叶病(TMV)诱导中的PRP有多方面的研究，但对烤烟(普通烟)的有关研究报道甚少；对抗赤星病诱导及与PRP的诱发的关系，至今未见报道；我们在以前的研究中获得很有意义的表型材料，这些材料被期望有助于了解烟草抗赤星病的发生和遗传运作机制，而PRP只是这项工作的一个视点。本文是这方面研究的初报(1993－1994年进行研究)。

一、材料和方法

1. 材料

(1) 烟草：用烤烟品种NC89及其3个抗赤星病的无性系(表1)，在严格杜绝烟草花叶病毒(TMV)通过管理侵染、白粉虱为害等一切可能的刺激的条件下，培育到7－9叶期备用，同时，烟苗要严格整齐一至、健壮。

表1　供试的烟草品种和品系

Table 1　Tobacco variety and lines to be used

品种(系)	来　源　和　特　性
NC89	感赤星病
NC89-TT	AT毒素胁迫体细胞的再生株后代，抗赤星病
NC89-V1	番茄条斑病毒弱株系N14诱导NC89后组织再生的植株后代，抗赤星病
NC89-V2	含卫星RNA的CMV株系SV52诱导NC89后，组织培养再生的植株后代

(2) 赤星菌株：挑战接种用强毒株TBA28。

(3) 诱导因子：列入表2。

(4) PRP标准：香料烟Xanthi-nc受病毒(TMV)侵染后分离[5]，由北京农业大学李怀方赠送。

2. 烟草诱导和取样

(1) 诱导处理：赤星菌弱毒株TBA16以孢子悬浮液(10^5孢子/ml)悬滴接种第4、5真叶[1]；TMV摩擦接种当时的心叶；烟酸(0.01%，w/v)、其他化学物质(均0.1%，w/v)、

SRS2(原制剂)均用喷雾法(长江-08 型小喷雾器)喷洒幼苗心叶以下叶片;创伤处理是在第 5、6 真叶中肋中部用昆虫针穿刺到 2mm 深处;均以空白的相应处理为对照;各处理 6 株烟苗,均匀取样。

(2) 取样:烟苗诱导后在 25℃±下定期取样,均取上部新长出的 2—3 片叶,每处理每次 10g,用于提取 PRP。

3. PRP 测定

(1) 提取:按 Boller 和 Metraux(1988)[2]的方法提取胞间 PRP。

(2) 总量测定:Folin 酚法[3],定量为 mg/cm^3 胞间。

(3) 电泳:在 Pan 等(1991)[4]方法的基础上略作改良,即浓缩胶用 3.75%、分离胶用 12%,加样量 150μl、浓缩胶长 3cm,浓缩胶电流 20mA、分离胶电流 30mA。

4. 挑战接种

依文献[1]的方法按设计时间进行。

5. 试验重复

以上各项试验的数值测定部分至少做 2 批次、每批次 3 个重复,结果取平均值。PRP 电泳重复 5 次,主要保证带的数目有重复性。

表 2 使用的诱导因子

Table 2 The inducers to be used

因 子	功能表现	因 子	功能表现
TBA16	诱导抗病性	水杨酸钠	诱导感赤星病
SRS2	诱导抗病性	烟 酸	诱导感病性
水杨酸	诱导抗病性	核黄素	诱导抗病性
TMV	未测	马来酰肼	诱导感病性
创伤	未测		

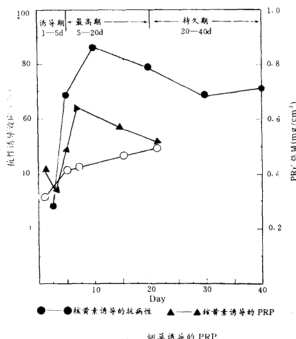
二、结　　果

1. 不同因子诱导 PRP 的发生

表 3 的结果说明了以下趋势:不同因子诱导 PRP 的总量与它们诱导抗病性的程序呈正相关的关系,这种量的关系在电泳带(图 2)上也有反映;但 SRS2 是个例外。

2. 诱发动态

(1) 抗病、感病诱导因子诱发 PRP 的时间变化:选出抗病诱导因子核黄素,测定它诱发 PRP 积累与诱导抗性之间的关系,表明二者时序变化相似,但 PRP 积累的最高期比诱导抗性的最高期提高两天,以后也有类似的时间差(图 1)。



烟草诱导的PRP

图1 PRP积累和诱导抗性动态

Fig. 1 Time sequences of elicitation and accumulation of PR proteins in relation to the sequence of induced resistance

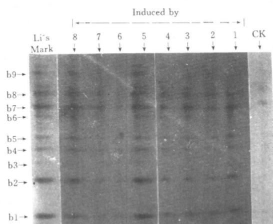
同时选用感病诱导因子烟酸作类似测定，结果(图1)是：它在各期诱导PRP的积累量比抗病诱导因子低0.1—0.3mg/cm³，同时，时序变化与核黄素诱发的PRP和抗病性动态不相一致。

(2) 抗、感诱导因子的交互影响：分析表4可知，当抗、感因子先后使用于烟草后，抗病诱导因子对PRP的诱导效应可以为感病诱导因子的施入所减弱；同时，感病诱导因子诱导PRP的负积累(与对照比)效应可以为抗性诱导因子的施入所减弱。这种交互作用依两类因子先、后使用的关系很有规律，例如，先施核黄素、后施烟酸时，PRP的积累量比空白对照高1.82倍、对核黄素的正向效应削弱60%、把烟酸的负向效应削弱7.17倍，而先施烟酸、后施核黄素时，3个比例依次为1.13倍、75%、4.47倍。带型表现见图2。

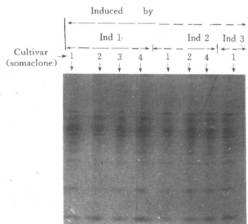
(3) 重复诱导的作用：表5说明，重复诱导可明显提高PRP的积累量。

3. PRP的组成型表达和诱导加强

从表6可看出，PRP在无性系NC89-TT和NC89-V1中组成型表达明显，在NC89-V2中为负积累(与对照NC89比)。但3个无性系PRP诱发对不同因子的反应能力明显提高，尤其是对创伤的反应，均强于NC89，对TMV侵染的反应能力接近或高于NC89。



NC89: 1, ribolfavin; 2. SRS2; 3. TBA16, spores; 4. wounding; 5. salicylic acid; 6. sodium salicylate; 7. ribolfavin/nicotinic acid; 8. SRS2/maleic hydrazide; CK, no treatment.



Inducers: Ind1=TMV infection; Ind2=wounding; Ind3=ribolfavin, 3 times of indution.

Cultivar(somaclone): 1. NC89-TT; 2. NC89-V2; 3. NC89-V1; 4. NC89.

图 2 电泳带谱选组拼图

Fig. 2 The electrophoresis picture of PR proteins of induced and constitutive expressions

另有一个重要趋势:无论是组成型还是诱导表达,都与对两种病害的诱导抗性相一致。带型见图 2。

表 3 不同诱导因子诱导烟草品种 NC89 产生的 PRP 的总量[1)]

Table 3 Total amounts of PR proteins from the intercellular spaces of tobacco cv NC89 immunized by different inducers

诱导因子	PRP 总量(mg/cm³ 胞间体积)[2)]	抗性诱导效应(%)[5)]
CK[3)]	0.142	
TBA16 孢子	0.121(0.85)[4)]	50—80
SRS2	0.057(0.44)	100(室内测定),23—82(田间测定)
核黄素	0.641(4.51)	78—86(室内测定)
水杨酸	0.189(1.33)	7—77(室内测定)
烟酸	0.036(0.26)	—420(室内测定)
马来酰肼	0.032(0.23)	—300(室内测定)
水杨酸钠	0.116(0.91)	—290(室内测定)
TMV 侵染	0.909(6.40)	未测
针刺创伤	0.694(4.89)	未测

1) 第 7 天取样。
2) 提取前用真空渗透法使胞间充满水。
3) 不加处理。
4) 括号内数字是与对照相比的倍数。
5) 第 12 天挑战。

表 4 抗病、感病诱导因子交互作用对 PRP 诱发的影响[1)]

Table 4 Effects of combined application of the resistance and susceptibility inducers on PR protein elicitation

先处理/后处理[2)]	PRP 总量 (mg/cm³)	交叉影响		
		比率 1	比率 2	比率 3
⑴核黄素/烟酸	0.258	①/⑤=1.85	①/⑥=0.40	①/⑧=7.17
⑵烟酸/核黄素	0.161	②/⑤=1.13	②/⑥=0.25	②/⑧=4.47
⑶SRS2/马来酰肼	0.109	③/⑤=0.77	③/⑦=1.19	③/⑨=3.41
⑷马来酰肼/SRS2	保存管冻裂、未测			
CK 系统:				
⑸不处理	0.142			
⑹核黄素	0.641			
⑺SRS2	0.057			
⑻烟酸	0.036			
⑼马来酰肼	0.032			

1) 品种 NC89。2) 间隔 3 天,第 7 天取样。

表 5 核黄素重复诱导的效果

Table 5 Effects of repeating induction with ribolfavin on PR protein accumulation

品种(系)	诱导次数	PRP 总量(mg/cm³)	PRP 增加(%)
NC89	0(CK)	0.142	
	1	0.641	451
	3[1)	0.824	580
NC89-TT	0(CK)	0.261	
	1	0.368	141
	3[1)	0.877	336

1) 连续 3 次,间隔一天。

表 6 PRP 在 3 个抗病无性系中的组成性和诱导表达

Table 6 Constitutive and induced expressions of PR proteins in the three somaclones with resistance to brown spot and TMV mosaic

无性系(品种)	表达类型	PRP 总量(mg/cm³)	诱导抗性(%)
NC89-TT	组成性表达(C)	0.261	
	核黄素诱导(R)	0.368	抗赤星:92
	TMV 侵染(T)	1.077	抗 TMV 花叶:75
NC89-V1	C	0.215	抗赤星:81
	T	0.809	抗 TMV 花叶:59
NC89-V2	C	0.041	
	R	0.662	抗赤星:74
	T	0.964	抗 TMV 花叶:75
	针刺(W)	0.927	
NC89	C	0.142	参见表 3
	R	0.641	
	T	0.909	
	W	0.694	

4. PRP 的种类和组群认定

图 2 提供了主要的抗病、感病诱导因子诱导的 PRP 和 PRP 在 3 个无性系中的组成型表达的电泳图,表 7 是初步归组和种类有(+)或无(—)的记录。有 3 点值得注意:①抗病诱导因子诱导的 PRP 主要在未定种类上有明显的有或无,而感病诱导因子诱导的 PRP 还在已归组的种类上与前者有差别;②抗病与感病诱导因子间的交互的影响主要在 b8(Q)和未定种类的有或无上存在差别;③组成型表达的 PRP 在 b6(O)和未定种类的有或无上存在不同。

表 7　诱导和组成型 PRP 的种类和归组

Table 7　Species and group of PR proteins of induced and constitutive expressions in relation to induced resistance of tobacco to brown spot

组	群	诱导因子[1]									组成性表达[2]		
Li(1992)	Friting 等 (1989)	CK	TBA16	SRS2	Rf	NA	Rf-NA	NA-Rf	SA	SSA	TT	V1	V2
	PR1												
b1	1a	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
b2	1b	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
b3	1c	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−
	PR2a												
b4	2	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
b5	N	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
b6	O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
	PR2b												
b7	P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
b8	Q	−	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+
b9	PR4	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
未归组													
b1-1		+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−
b4-1		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
b6-1		−	−	−	+	−	+	+	+	−	−	−	+
b6-2		−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	+
b7-1		−	−	−	+	+	−	−	−	−	+	−	+
b8-1		−	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+
b8-2		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
b9-1		−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	+
b9-2		−	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+

1) CK＝No treatment；Rf＝ribolfavin；NA＝nicotinic acid；SA＝salicylic acid；SSA＝sodium salicylate.

2) TT＝NC89-TT；V1＝NC89-V1；V2＝NC89-V2.

三、结　论

1. PRP 诱导与诱导抗性的关系

是一种正相关，表现在 PRP 的积累量与表型抗病程度的一致、抗病和感病诱导因子对 PRP 诱发的正向和反向效应与表型抗性增强或减弱的一致两方向，这不仅适于赤星病，还适于测定的 TMV 花叶病。

2. 不同诱导因子的作用

抗病性诱导因子对 PRP 的诱发起正向效应，感病性诱导因子起负向效应，二者的交互作用主要是影响 PRP 的积累和未定种类 PRP 的有和无上，少数是在已知组群种类的有或无上。

3. 抗赤星病诱导中特异性 PRP 的产生

从表 7 知道，在抗赤星病诱导中不同因子刺激可诱发出 9－14 种 PRP，根据李怀方(1992)[5]的样品标准和 Frigit 等(1989)[6]的分类体系，判定有 2－5 种类群不能确定，加上在已确定类群的至少一种新产生蛋白质，可以认为 3－6 种 PRP 是在抗赤星病诱导中新产生的和特异的。

4. PRP 的组成性表达

3 个抗病的无性系在 PRP 的种类和量上，都能组成性地表达，同时对不同诱导因子刺激发生反应的能力增加。

四、讨　　论

导致以上 4 个结论的本项研究，从对 PRP 发生和抗病关系一般原理的了解、烤烟类烟草少有此类研究、对赤星病的此类研究尚无人做、PRP 的组成型表达等方面看，既有一般的、也有针对性的意义。

下一步可以预测结果的研究必须是：①PRP 总量的差别对应于不同组群、种类的差别；②进一步查证前人的结果或试验，确定未定种类的组群。具有广泛的意义的研究包括：①酶类(PR2 组)和非酶类 PRP 的功能；②从抗病、感病诱导因子对诱发 PRP 的正向、负向效应和 PRP 的组成型表达出发，了解 PRP 诱发及诱导抗性的遗传运作机制。

值得一提的是，我们在研究中发现，保证对照不受刺激非常重要，大多数 PRP 很容易受不同因子刺激而产生，这使得人们很难实现上述研究目的。

参 考 文 献

[1] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力分化和弱毒株抗性诱导作用的研究，植物保护学报，1992，**19**：87－91。

[2] Boller, T. H., Mettaux, J. P., Extracellular localization of chitinase in cucumber. Physiol. Mol. Plant Pathol., 1988, **33**: 11－16.

[3] 张志良、吴光耀，植物生物化学技术和方法，北京：农业出版社，1986，111－112。

[4] Pan, S. Q., Ye, X. S., Kuc, J., A technique for detection of chitinase, β-1,3-glucanase, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. Phytopathol., 1991, **81**: 970－974.

[5] 李怀方(Li, H.)，植物抗病毒侵染机制的电生理学研究，博士论文，北京农业大学，1992。

[6] Fritig, B., Kauffmann, S., Stinzi, A., Geoffroy, P., Signal Molecules in Plants and Plant-microbe Interactions. NATO AST Ser. H: Cell Biol. Vol. 36(Lugtenberg, B. J. J. ed.). Wien: Springer-Verlag, 1989, 161－168.

OCCURRENCE OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS DURING ELICITATION OF TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT

Dong Hansong, Wang Shaohua, Liu Aixin and Zheng Jifa

Inducible accumulation and constitutive expression of intercellular pathogenesis-related(PR)protein were observed as related to induced resistance of flue-cured tobacco against brown spot. The inducible accumulation in the cultivar(cv) NC89 was elicited by infection of TMV and hypovirulent strain TBA16 of *Alternaria alternata*, wounding, and leaf-contact (spraying) with SRS2, a preparation with resistance induction (see related paper in this Part), and 5 species of chemicals which include resistance and susceptibility inducers. The constitutive expressions were testified in the 3 resistant somaclones NC89-TT, NC89-V1 and NC89-V2 (this Part). PR proteins were identified electrophoretically and measured quantitatively in relation with degree of induced resistance to brown spot and TMV mosaic. Four aspects of conclusive results were acquired as follows:

1. Positive correlations exist of the inducible accumulation and constitutive expression of PR proteins with the degree of induced resistance to brown spot and TMV mosaic, in both the species and amounts of the proteins.

2. The resistance inducers(RIs) gave positive effects of eliciting occurrence and accumulation of PR proteins, while the susceptibility inducers (SIs) gave negative effects on occurrence and accumulation of the proteins. The combined effects of the RIs with SIs were mainly to reduce the accumulation amounts, and in some cases, to result in presence or absence of special species of PR protein.

3. The posibility of eliciting new species of the proteins was proved. In the electrophoresis pictures, at least 9—14 species of PR proteins can be elicited by different inducers and express constitutively in the 3 somaclones. Of them, at least 3—6 species undetermined in the known classification system (Fritig et al., 1989; Li, 1992), were suggested to be special for induction of tobacco resistance to brown spot.

4. The constitutive production in the 3 somaclones were indicated by accumulation amounts and presence or absence of special species of the proteins. Also, ability of response to stimulation by different inducers was evidently enhanced in the somaclones, as compared with their parent cv NC89.

AT 毒素胁迫体细胞诱导烟草抗赤星病的研究：1. 抗毒素愈伤组织的诱导

卢培秀　董汉松　王智发　郑继法

利用组织培养技术进行抗病变异系筛选有两种常用方法[1,2]：一是无胁迫选择，目标是定向筛选体细胞无性系变异(SV)中的抗病性变异；一是胁迫选择，病原物或毒素作为胁迫因子，可以把SV抗病性变异和毒素的抗性诱导作用相加权。这两种方法已被成功地用于多种作物对不同病害的抗性改良[4]，但在烟草抗赤星病中研究很少，尤其在我国还是空白。作者试图摸索一套适用于烟草抗赤星病诱导的毒素胁迫和组织培养方法，本文是其中的第一部分(1991年进行研究)。

一、材料和方法

1. 烟草品种

NC89、NC82、K326、中烟 86(ZY86)。

2. 菌株

烟草赤星菌(*Alternaria alternata*)TBA28 是一个强致病力菌株[3]，产 AT 毒素能力也很强[4]。

3. 粗毒素制备

TBA28 菌株在 PDA 培养基[5]平板上繁殖(25℃)10—15 天后，用内径 4mm 的打孔器在菌落边缘菌丝生长均匀处打取菌落圆片。将菌落圆片按每瓶 3 片加入到盛有 150ml 查氏培养液[5]的圆底烧瓶中，25℃下振荡培养 28 天后过滤，所得滤液即为粗毒素液。

4. 愈伤组织的诱导和继代培养

(1) 培养基：愈伤组织诱导培养使用下述 3 种。① MS-11[6]：MS 基本培养基(MS)+4.5μmol 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)+酪蛋白水解物(CH)2g/L；② MS-12[6]：MS+6-苄基腺嘌呤(BA)0.2μg/ml+2,4-D 1μg/ml；③ MS-13[7]：MS+BA2μg/ml+吲哚乙酸(IAA)0.2μg/ml。

愈伤组织继代培养使用 MS-2[6]培养基，其成分为：MS+4.5μmol 2,4-D。

(2) 操作步骤：从生长一致的烟苗上取心叶表面消毒后剪去叶缘，将叶片切成 0.5×0.5cm 的小叶碟置于愈伤组织诱导培养基上，在 25—28℃、相对湿度 50%左右、光/暗周期 16 小时/8 小时、光强 1 000—1 500lux 条件下培养，每培养 3—4 周继代一次。

5. 抗毒素愈伤组织胁迫培养基的选择

(1) 培养基:诱导烟草愈伤组织抗性的 AT 毒素胁迫培养基的组成为 MS-2+AT 毒素。

(2) AT 毒素形态选择:经过滤灭菌和高温湿热(121℃,20 分钟)灭菌的 AT 粗毒素分别用无菌水按倍比稀释到 1/128。2 种形态的粗毒素每个稀释度各取 50ml 装入洁净小杯。将生长一致的 2—3 叶期烟苗洗净根后插入杯中,每杯 8—10 株,以相同稀释度的查氏培养液作为空白对照,以无菌水处理对照判定烟苗的自然萎蔫率。96 小时后观察结果。

(3) 胁迫培养基的制备:用两种方法分别制备含 AT 毒素的胁迫培养基:① 在培养基高温湿热灭菌前加入 AT 粗毒素;② 在高温湿热灭菌后冷却至 40℃左右时加入 AT 粗毒素。培养基内 AT 粗毒素的含量都是:0、33%、45%、50%、60%,向培养基中移入烟草愈伤组织块,培养 28 天后比较愈伤组织的存活率。

(4) 毒素适宜含量的确定:在胁迫培养基中,AT 粗毒素含量设 6 个压力梯度:0、15%、30%、45%、60%、75%。将不同品种大小一致(约 $1mm^3$)的愈伤组织块分别置于其中,4—5 周后比较不同浓度下愈伤组织的存活率。胁迫培养基中 AT 粗毒素的适宜含量范围被大致定为:使愈伤组织死亡率达 50%以上但不至全部死亡。

二、结果与分析

1. 烟草愈伤组织诱导培养基的选择

(1) 愈伤组织在不同培养基上的形成和发育:烟草叶碟分别在 MS-11、MS-12、MS-13 培养基上培养 2—3 天后,叶块组织明显膨大;一周后主要在叶碟边缘叶脉切口处出现乳白色或淡黄色结晶状愈伤组织,渐突出为不规则头状或半圆形;部分叶碟的边缘切口与培养基接触面出现褐红色素,渐变黄褐色至黑色,失去生活力。愈伤组织在 2—3 周内生长达到高峰,3—4 周出愈率基本稳定。

品种 NC89 和中烟 86(ZY86)的叶碟在 3 种培养基上培养 4 周后愈伤组织的形成和发育情况见表 1。MS-11、MS-12 和 MS-13 均能诱导产生具有较强生活力的愈伤组织,出愈率都在 80%以上。但愈伤组织的发育状况有所差别,在 MS-11 上,愈伤组织保持乳白色,而在 MS-12 和 MS-13 上,愈伤组织在第 3 周便开始部分转绿,并产生芽点。这表明这 3 种培养基均适于诱导烟草外殖体产生愈伤组织,但 MS-12 和 MS-13 还可促使愈伤组织分化。

表 1 烟草愈伤组织(CA)在不同培养基上的发育情况

Table 1 Production of tobacco callui on different media

培养基	烟草品种	培养叶碟数	出愈叶碟[1]		CA 生长阶段[1]
			块 数	出愈率(%)	
MS-11	ZY86	26	22	84.6	保持乳白色
	NC89	30	27	90.0	
MS-12	ZY86	30	27	90.0	转 绿
	NC89	25	24	96.0	
MS-13	ZY86	25	22	88.0	开始出芽
	NC89	30	28	93.3	

1) 培养 28 天后检查。

(2) 不同品种在 MS-11 上的愈伤组织诱导:烟草 4 个品种的叶碟在 MS-11 培养基上培养两周后产生可见的愈伤组织瘤,出愈率为 50.7－58.7%,至第 4 周出愈率基本稳定,达 38.3%－91.7%,其中 NC89 和 K326 的出愈率较高,达 90%以上;NC82 次之(88.3%);中烟 86 最低(表 2)。这表明烟草不同品种在此培养基上产生愈伤组织的能力虽有差异,但都可达到满意的出愈率。可见,MS-11 培养基适于烟草不同品种的愈伤组织诱导。

表 2 不同品种叶碟在 MS-11 上愈伤组织发育情况

Table 2 Callus production of different cvs on MS-11

烟草品种	培养叶碟数	出愈块数		出愈率(%)	
		4 天	28 天	4 天	28 天
K326	60	35	55	58.3	91.7
NC89	75	44	68	58.7	90.7
NC82	60	33	53	55.0	88.3
ZY86	75	38	64	50.7	85.3

2. AT 毒素胁迫的适用形态和适宜量

(1) AT 毒素形态:经高温(121℃,20 分钟)湿热灭菌和未经高温处理的无菌 AT 毒素,在浸根处理中对烟苗的作用及在胁迫培养基中对愈伤组织的作用,分别列入表 3 和表 4。由表看出,两种形态的 AT 毒素在不同品种烟草幼苗和愈伤组织上的致病力完全一致。这表明高温处理对毒素的致病力无影响,AT 毒素是一种耐高温型毒素,经高温灭菌的 AT 毒素可以作为胁迫培养基中的适用形态。

表 3 烟苗经两种形态 AT 毒素处理的萎蔫率(%)[1)]

Table 3 Frequency (%)[1)] of wilt plants of tobacco seedling treated with AT-toxin in 2 forms

烟草品种	毒素形态	毒素稀释倍数								
		0 (水)	1	2	4	8	16	32	64	128
NC89	① 高温蒸汽灭菌	0	100	100	100	100	66	50	18	0
	② 过滤灭菌	0	100	100	100	100	66	50	18	0
	CK[2)]		83	50	0	0	0	0	0	0
NC82	①	0	100	100	100	100	65	30	0	0
	②		100	100	100	100	65	30	0	0
	CK	0	80	50	0	0	0	0	0	0
K326	①	0	100	100	100	75	33	0	0	0
	②		100	100	100	75	33	0	0	0
	CK	0	75	40	0	0	0	0	0	0
ZY86	①	0	100	100	100	75	20	0	0	0
	②		100	100	100	75	20	0	0	0
	CK		75	40	0	0	0	0	0	0

1) 96 小时检查。

2) 查氏培养液。

烟草 4 个品种对毒素的抗性不一。烟草愈伤组织的存活率经校正(表 4)去除自然死

亡因素后(表5),不同品种在细胞水平上对AT毒素的抗性从高到低依次是中烟86、K326、NC82、NC89。这与表3所显示的在整株水平上的反应一致,表明烟草在整株水平和细胞水平上对AT毒素的抗性是一致的。

表4 愈伤组织在毒素胁迫培养基上的存活率(%)

Table 4 Survival frequency(%) of tobacco calli cultured on AT-toxin containing medium

烟草品种	毒素形态	毒素浓度 (%. v/v)				
		0	33	45	50	60
NC89	(1) 高温蒸汽灭菌	100	83.0	74.5	52.0	18.8
	(2) 过滤灭菌	100	82.7	74.5	52.2	19.2
NC82	(1)	90.0	72.9	66.0	49.0	18.8
	(2)	90.0	72.0	65.0	48.0	17.8
K326	(1)	100	85.2	77.1	63.6	41.9
	(2)	100	85.0	76.9	62.7	41.2
ZY86	(1)	83.0	74.0	66.7	60.0	50.0
	(2)	83.0	74.4	66.1	60.0	51.0

表5 表4中愈伤组织存活率的校正值

Table 5 Varified values[1] of the frequency(%) in Table 4

烟草品种	毒素浓度(%,v/v)[2]			
	33	45	50	60
NC89	83.0	74.5	52.0	18.8
NC82	81.0	73.3	54.4	20.9
K326	85.2	77.1	63.6	41.9
ZY86	89.2	80.4	72.3	60.2

1) 消除自发死亡的因素。

2) 高温蒸汽灭菌。

(2) 适用量:在胁迫培养基中,将AT毒素含量从0—75%(v/v)分6个压力梯度处理4个烟草品种的愈伤组织,在AT毒素浓度不同的培养基上生长4—5周的存活情况见表6。当AT毒素含量为15%时。愈伤组织生长势与对照相差不大;当含量为30—45%时,4个品种的愈伤组织存活率仍很接近,但生长势表现略低于对照;在含量为60—75%时,愈伤组织的生长明显受抑制,而且品种间抗毒素的差异明显表现出来(图1)。以愈伤组织死亡率达50%以上为标准,品种NC89、NC82适宜的AT毒素胁迫含量为50—75%,K326为55—75%,而中烟86应高于65%。

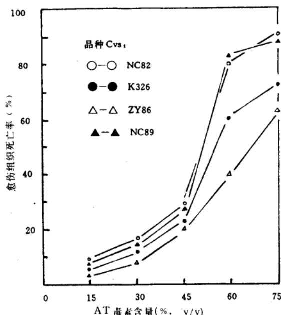


图 1 烟草愈伤组织在胁迫培养基上的相对死亡率

Fig. 1 Death ratio of tobacco callus on the medium containing AT-toxin

表 6 烟草不同品种愈伤组织抗毒素筛选的情况

Table 6 Resistance of tobacco calli to AT-toxin

品 种	愈伤组织	胁迫培养基中毒素含量（%,v/v）					
		0(CK)	15	30	45	60	75
NC89	处理块数(NT)	50	50	44	47	48	57
	存活块数(NS)	50	47	38	35	9	8
	存活率(%)(NR)	100	94.0	86.4	74.5	18.8	14.0
NC82	NT	50	51	45	50	48	54
	NS	45	43	34	33	9	6
	NR	90.0	93.7	84.0	73.3	20.8	12.3
K326	NT	47	50	52	58	43	55
	NS	47	48	45	37	18	16
	NR	100	96.0	86.5	77.1	41.9	29.1
ZY86	NT	53	53	45	51	48	50
	NS	44	43	34	34	44	15
	NR	83.0	97.7	91.0	80.3	60.2	36.1

三、讨　　论

MS-11、MS-12 和 MS-13 培养基均可诱导烟草不同品种外殖体以较高的机率产生愈伤组织，说明用组织培养技术改良烟草品种有较广的适用性。培养基的选用可因试验目的而不同。若以获得愈伤组织为目的，则可选用 MS-11，愈伤组织在该培养基上诱导形成后可保持旺盛生长而不分化；如要直接获得烟草再生株则以 MS-12、MS-13 为宜，愈伤组织诱导产生后较快发生分化而得到再生烟芽。

AT 毒素是一耐高温毒素，这在以前的资料中未见报道。这对 AT 毒素胁迫培养基的制备提供了许多便利，可以直接将一定量的 AT 粗毒素按一定比例加入培养基中，然后经高温湿热灭菌备用，这避免了向已灭菌培养基中添加 AT 毒素较繁琐的配比计算和操作。

所测的 4 个代表性的烟草品种在整株水平和细胞水平上对 AT 毒素抗性一致，且抗性趋势与以前用孢子悬浮液对幼苗和离体叶片接种的抗性测定结果[1,4]一致。这是粗毒素作为胁迫因子通过加强体细胞无性系变异诱导抗病性的条件之一[4]；同时，利用 AT 毒素处理愈伤组织还可以用作对烟草品种(系)的抗病性进行鉴定[8,9]。

胁迫培养基中毒素的适宜含量的确定取决于毒素致病作用的强弱和待处理愈伤组织的抗性大小。本文提出的不同品种的适宜的胁迫压力，可以为某些已知抗性程度的烟草品种在确定胁迫培养基中 AT 粗毒素适宜的含量时提供参考。

参　考　文　献

[1] Daub, M. E., Annu. Rev. Phytopathol., 1986, **24**: 159—186.

[2] Hartman, C. L. et al., Plant Sci. Lett., 1984, **34**: 183—194.

[3] 董汉松等，山东农业大学学报，1989，**20**(2)：1—8。

[4] 董汉松等，山东科学，1993，**6**(2，植物病理转辑)：39—46。

[5] 方中达，植病研究法，北京：农业出版社，1979。

[6] 颜昌敬编著，植物组织培养手册，上海：上海科学技术出版社，1990，254—256。

[7] 杜　杰等，生物工程学报，1988，**4**(2)：110—118。

[8] Hartman, C. L. et al., Physiol. Mol. Plant Pathol., 1986, **28**: 353—358.

[9] Deaton, W. R. et al., Theor. Appl. Genet, 1982, **63**: 65—70.

INDUCTION OF TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT *VIA* SOMACLONE STRESS WITH AT-TOXIN：1. SOMATIC INDUCTION FOR TOXIN RESISTANCE

Lu Peixiu, Dong Hansong, Wang Zhifa and Zheng Jifa

Conditions of producing toxin-resistant somaclones of the plant by callus culture were studied, to improve resistance of the widely planted cultivars of tobacco (*Nicotiana tabacum*) to brown spot through somatic variation pressured with AT-toxin of the pathogen *Alternaria alternata*. The discs from heart leaves of 4 cvs were cultured on media MS-11, MS-12, and MS-13, and calli formed at over 80% ratio after 28 day culture. The calli remained un-differentiated growth on MS-11, while began to bud differentiation on MS-12, and MS-13 at 21 days of culture. Two forms of AT-toxin were used for selecting resistant calli, and no significant difference in pathogenicity to both the callus and seedling between filtrating- and heat-disinfected (121℃, 20min) toxins. Positive correlation was evidenced of callus resistance with seedling resistance to the toxin. Susceptibility of callus to AT-toxin in the stress medium was different in cvs, indicated both by survival frequancy (SF) which reduced as increase of toxin contents in the medium, and by semi-lethal dose (SLD) which was 50－75% for different cvs. The SF, SLD, and frequency of somaclones with toxin resistance were taken as the conditioned factors for determining minimal concentration of AT-toxin for creaming toxin-resistant callus, which was 50% for cvs NC89 and NC82, 55% for cv K326, and 65% for cv ZY86.

AT 毒素胁迫体细胞诱导烟草抗赤星病的研究：2. 从抗毒素愈伤组织再生抗病植株

卢培秀　董汉松　王智发　郑继法

在用细胞工程对植物抗病性进行改良时，既要保留品种原有的好性状，又要提高抗病性变异和选择机会。这对烟草赤星病来说显得特别重要。因为我国长期依赖进口品种（如NC89、NC82、K326），它们农艺性状和品质性状优良，但高感赤星病，成为该病近年在全国烟区大流行并造成严重损失的主要原因[1]。赤星菌（*Alternaria alternata*）AT 毒素作为致病因子和抗性诱导因子的特性[2]提出了它作为组织培养中抗病性胁迫因子的可行性，但依据前人的研究，短期胁迫不能得到抗病再生株[3]或得到的机率很低[4]，而长期胁迫在明显提高抗病植株再生率的同时，又伴随着不良变异（如形态畸变）率的提高[3,4]。由于在烟草赤星病中有关研究很少，因此建立用于由抗毒素无性系筛选到抗病植株再生的技术和操作条件还是一项新的任务，本文报道这方面的研究结果（1992 年进行研究）。

一、材料和方法

1. 寄主和病原物材料

烟草品种用 NC89、NC82、K326、中烟 86(ZY86)，病菌菌株 TBA28 为强毒株[2]，用来产生毒素和接种烟苗。

2. 培养基

先后使用以下培养基：① AT 毒素胁迫培养基：MS[5]＋4.5μmol 2,4-D＋AT 毒素。② 诱导分化培养基(MS-3)：MS＋5μmol 6-苄基氨基嘌呤(BA)。③诱导生根使用下述 3 种培养基并比较诱导效果：MS-41 即 MS 基本培养基[6]；MS-42 为 MS＋0.5%(w/v)活性炭；MS-43 是 MS＋110μmol 3-氨基吡啶[5]。

3. 毒素制备

方法同前[7]。

4. 抗毒素愈伤组织的筛选方法

取不同品种生活力旺盛的愈伤组织块（约 $1mm^3$）移入含粗毒素 60%的胁迫培养基中，经培养筛选出存活下来的愈伤组织，再转入粗毒素含量为 75%的胁迫培养基中进行第 2 次筛选，存活下来的抗毒素愈伤组织便可用于诱导再生以获得抗性株[3]。

5. 愈伤组织的分化诱导

不同品种不同处理的愈伤组织转入诱导分化培养基(MS-3)上进行分化培养，形成芽

点后再转一次培养基(MS-3)，芽长至1－2cm高时，可切下转入生根诱导培养基。

6. 生根诱导及再生苗移栽

(1) 生根诱导培养基的选择：将未加AT毒素处理的1－2cm高的再生芽转入MS-41、MS-42和MS－43培养基中培养，观察生根及再生苗生长状况，选择出适宜的生根诱导培养基。然后比较不同品种在不同的毒素浓度下的生根能力和根的生活力。

(2) 再生苗移栽：再生苗在生根诱导培养基上长至3－5叶时移栽到花盆(12×12cm)中，以正常移栽的同品种烟苗为对照，观察移栽后幼苗成活和生长情况。

7. 再生植株抗病性测定

按以前使用的方法[2]对叶片进行悬滴接种，每个品种(和其再生植株)重复4，每次重复12株苗；诱发病害后检测位点发病率和病斑面积，统计结果取平均值。

二、结果与分析

1. 抗毒素细胞系的筛选

生活力一致的新鲜愈伤组织块移入含AT毒素60%的胁迫培养基上培养4－5周后，品种NC82、NC89、K326、中烟86分别有18.8%、18.7%、41.7%、50%的愈伤组织块存活下来，但颜色变黄，生长速度明显受到抑制；其余的愈伤组织变黑死亡。存活下来的愈伤组织再转入含毒素75%的胁迫培养基上复筛，4－5周后4个品种的存活率明显降低(表1)。

2. 抗毒素愈伤组织的芽分化性能

烟草4个品种经不同毒素浓度、不同次数及不同培养时间等处理的愈伤组织块当转入MS-3培养基进行分化培养后，培养前期(1周左右)愈伤组织块迅速膨大，至两周后便有绿色芽点形成，3－4周内逐渐有单生或丛生的芽出现；不分化的愈伤组织块只膨大，呈黄褐色，有的甚至整块转绿但不形成芽点。此时，不同品种、不同毒素浓度处理的芽分化能力的差异已明显表现出来。结果(表2)表明，不同品种之间愈伤组织的再生能力存在明显差异(图1)。同品种不同继代培养时间的愈伤组织其芽分化率非常接近，而不同处理浓度的愈伤组织再生能力有所差异，说明烟草愈伤组织的再生能力在继代培养过程中基本保持稳定。而在毒素含量高的胁迫培养基上长时间培养，再生能力明显下降。

表1 抗毒素愈伤组织(CA)重复筛选的情况

Table 1 Selection of toxin-resistant callus(CA) in 2 circulations of AT-toxin stress culture

烟草品种	CA块数	第一次筛选[1)]		第二次筛选[2)]	
		存活CA数	存活率(%)	存活CA数	存活率
NS89	75	14	18.7	3	4.0
NC82	80	15	18.8	3	3.8
K326	60	25	41.7	8	13.3
ZY86	60	30	50.0	10	16.7

1)、2) 中毒素浓度分别为60%、75%(v/v)。

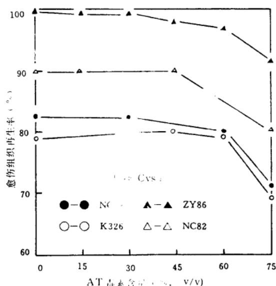


图 1　不同品种不同处理的愈伤组织再生率

Fig. 1　Regenerating ratio of calli from different cvs as related to the toxin concentration in the stress medium

表 2　愈伤组织(CA)以不同毒素浓度、不同时间胁迫培养后的生芽情况

Table 2　Regenerating ability of toxin-resistant calli in relation to toxin contents and culture times

烟草品种	毒素浓度(%,v/v)		培养时间	转分化用	生芽的	再生率
	第一轮	第二轮	(天)	CA 块数	CA 块数	(%)
NC89	0		20	17	14	82.4
	0		90	15	12	80.0
	60		36	24	19	79.2
	60	75	96	14	10	71.4
NC82	0		22	19	17	89.5
	0		90	18	16	88.9
	45		42	27	24	88.9
	60		42	35	30	85.7
	60	75	90	10	8	71.4
K326	0		22	18	14	77.8
	0		90	19	15	78.9
	45		42	38	30	78.9
	60		42	32	25	78.1
	60	75	90	9	6	66.7
ZY86	0		20	17	17	100
	0		90	15	15	100
	60		36	42	41	97.6
	60	75	96	11	10	90.9

3. 生根诱导及再生苗移栽

（1）生根诱导培养基的选择：当1—2cm的绿芽被转入生根培养基中培养时，生根能力与所用培养基有关（表3）。在MS-41和MS-43培养基上约经一周时间，芽段基部便有白色茸毛状细根生出，到第4周生根率都达100%，并伴随绿芽生长扩展成小苗。在MS-42培养基上生根较晚，到第2周时才见有根生出，至第4周生根率只有40%左右，而且根细弱、稀少，幼苗矮小、长势弱。可见，MS-41和MS-43用于生根诱导较为理想。

表3 不同培养基诱导生根的效果

Table 3 Rooting capability of budded callus in different media

培养基	烟草品种	测定芽段数	生根能力[1]		苗长势[1]
			生根芽段数	生根率	
MS-41	NC89	30	30	100	强
	ZY86	30	30	100	强
MS-42	NC89	15	6	40.0	弱
	ZY86	12	5	41.7	弱
MS-43	NC89	15	15	100	强
	ZY86	15	15	100	强

1）培养28天检查。

（2）再生苗的移栽和生长：MS-41培养基上，不同品种不同毒素浓度处理的再生芽均能在一周后开始形成白色茸根，到第4周生根率都达100%，但在根的数量和健壮程度上稍有差别，但不至影响移栽成活。当在4—5叶时移栽后，各品种不同处理的幼苗成活率都达100%；再生苗在土壤中的长势与对照相似。

4. 再生植株的抗病性

不同处理的愈伤组织经诱导再生后，在温室内测定其抗病性变化，结果（表4）表明，组织培养时未加AT毒素胁迫的再生株，在2个品种中都未得到抗病较对照提高的个体；从只经一次毒素筛选的再生株中可以得到6—8%的抗性个体，经两次毒素胁迫的再生株中，抗性率明显提高，超过了40%，说明AT毒素胁迫浓度的提高和胁迫时间的延长，可以明显提高再生株中抗性个体的比率。

表4 从抗毒素愈伤组织再生的植株对赤星病的反应

Table 4 Resistance to brown spot of regenerated plants (PRs) from toxin-resistant calli

烟草品种	筛选次数[1]	再生总株数	对赤星病的反应[3]		
			R	M	S
NC89	O(CK)[2]	20	0[4]	0	0
	1	33	6.3	93.7	0
	2	19	42.1	57.9	0
ZY86	0	25	0	96.0	4.0
	1	50	8.0	90.0	2.0
	2	25	44.0	56.0	0

1）指抗毒素CA筛选。2）培养基中不加毒素。3）R、M、S指抗、中、感，均与对照比。4）数字指R、S或M再生株所占百分比。

三、讨　　论

胁迫压力的提高和胁迫时间的延长可以明显降低愈伤组织的存活率，但可以同时提高存活愈伤组织中抗病性正向变异的细胞系的比例。胁迫时间的延长会使不良变异频率提高[3,4]，芽的分化能力也随之下降，本研究表明高胁迫压力、短期处理可以较好地解决这个矛盾。这同时需要一套适宜而简单的培养和筛选条件，以下两点值得注意：① MS-41 和 MS-43 培养基都能诱导不同品种的再生芽以 100%的比率产根成苗，而 MS-41 培养基虽比 MS-43 缺少 100μ mol/L 3-氨基吡啶，但仍能达到同样的诱根效果。②对愈伤组织抗毒素能力的重复胁迫可以作为提高抗病性变异频率和程度的手段；但同时影响芽分化能力。

从抗毒素的愈伤组织得到的再生根株抗病性明显提高，这是通过细胞工程改造抗病性的基本条件。但再生植株抗病性的定向选择同时包括对不良变异的汰除；从抗病再生株到它的应用，还有一个关键问题是毒素诱导的抗病性的稳定性和向后代的遗传。对这些方面的研究，我们将另文报道。

参 考 文 献

[1] 董汉松等，中国烟草学报，1993，**1**(4)：66—70。

[2] 董汉松、于建立，植物保护学报，1993，**20**：129—134。

[3] Thanutong, P. et al., Theor. Appl. Genet., 1983, **66**: 209—215.

[4] Hartman, C. L. et al., Plant Sci. Lett., 1984, **34**: 183—194.

[5] 颜昌敬编著，植物组织培养手册，上海：上海科学技术出版社，1990，258—260；459—463。

[6] 杜　杰等，生物工程学报，1988，**4**(2)：10—118。

[7] 董汉松等，山东科学，**6**(2)：39—46。

INDUCTION OF TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT *VIA* SOMACLONE STRESS WITH AT-TOXIN: 2. REGENERATION OF DISEASE-RESISTANT PLANTS

Lu Peixiu, Dong Hansong, Wang Zhifa and Zheng Jifa

Tobacco cvs NC89, NC82, and K326 are widely planted and seriously impaired by brown spot in China, and were used for improvement of the disease resistance by somatic variation pressured with AT-toxin of *Alternaria alternata*, in which ZY86, a native cultivar with more resistance, was taken as cross reference. Calli from heart leaf discs were selected for toxin-resistance in two circulations where 60% and 75% toxin (v/v)

was mixed into the stress medium in the first and second circulation, and produced 19—15% and 4 — 17% toxin-resistant calli respectively. The budding differentiation and growth capacity of budded calli were observed on medium MS-3 and showed evident difference in cvs, with an order from strong to weak of ZY86, NC82, NC89 and K326. Frequency of budded calli was correlated negatively to toxin contents and pressuring period, and 70—98% budded calli were obtained when they had undergone the 2 selection circulations and then cultured for 90—96 days. Rooting of the budded calli was induced on 3 media and the best effects (100% rooting ratio) were on media MS-41 and MS-43. The regenerated seedlings were planted at the 4th to 5th leaf stage and grew vigorously at 100% survival rate. The resistance to brown spot of the regenerated plants was tested by droplet inoculation with conidial suspension of the pathogen. Degree of resistance enhancement in regenerated plants was positively related to the toxin contents and pressuring period in selection of toxin-resistant callus. When the regenerated plants were from the 2 circulation selected calli, 42—44% plants showed significant increase in the disease resistance.

AT 毒素胁迫体细胞诱导烟草抗赤星病的研究：3. 再生植株抗病性的定向筛选

董汉松　卢培秀　刘爱新
孙衍坤　王智发　郑继法

AT 毒素胁迫体细胞诱导烟草抗赤星病的研究有 3 个相关的起始点：① 它是把体细胞无性系变异(SV)与植物诱导抗性结合起来的一种试验途径[1]；② 对抗病植株再生的程序和方法前人研究很少，特别是因为待改善品种和起始材料的不同，需要从新摸索；③ 对待改良品种原有好性状的保持，该品种始终可以作为对照，但对不良变异的汰除，也因所用起始材料、待改良品种的不同需要从新探讨。对第一、二点作者已有专文报道[1,2]，本文是对第三方面的研究结果(1992－1993 年进行研究)。

一、材料和方法

1. 材料

(1) 烟草品种：烤烟品种 NC89 和中烟 86(ZY86)的种子分别由本研究室和中国农业科学院烟草研究所提供。

(2) 赤星菌株：制备 AT 毒素和接种烟苗的赤星菌(*Alternaria alternata*)菌株都是 TBA28，由本研究室分离、保存[3]。

(3) 培养基：诱导 CA、生芽、生根的培养基分别是 MS-11、MS-3、MS-43[4]，加入毒素的方法见参考文献[2]。

(4) AT 毒素：用的是粗毒素，制备方法见参考文献[5]。

2. 抗病再生植株的诱导

大致程序是：从烟草幼苗心叶取叶碟在 MS-11 上诱导出 CA，然后依次加 60%、75%(v/v)AT 毒素作两轮筛选；抗毒素 CA 在 MS-3 上生芽后在 MS-43 上长根；第一次再生株移栽；CA 抗毒素诱导时设不加毒素的对照。具体步骤、方法和条件见参考文献[2]。

3. 抗病再生株无性系 NC89-TT 的获得

从品种 NC89 叶碟第一次再生的抗病植株上再取叶碟，经 CA 毒素胁迫、芽、根诱导后产生第二次再生植株，这些植株即 NC89-TT；获得的种子保存在山东农业大学烟草研究室。具体方法见参考文献[2]。

4. 测定内容和标准

(1) 在原生苗阶段汰除畸形株：汰除生长有明显缺陷的幼苗：根系发育不良；植株白化、扭曲或其他严重变形；叶片严重皱折等，至迟在移栽(3－5 叶)前汰除。

（2）再生株形态畸变类型及定量计测和汰除：分类描述：节间变长或短、叶片变狭或宽等均以超出正常 1/2 以上、并在生长过程中不能恢复正常为准；对形态畸变的再生株至迟在作抗病性鉴定前汰除。

（3）再生株的生长发育观测：分生长势、结籽能力、种子萌发能力 3 项，均在花盆（23×23cm）中进行。

（4）NC89-TT 的抗病性鉴定：以起始品种 NC89 为对比，分幼苗（3－4 叶）抗毒素、成苗（7－9 叶）抗孢子侵染能力。抗毒素能力依参考文献[8]的方法，各处理 40 棵小苗，计测 48 小时的病情指数。抗孢子侵染能力依悬滴接种法[3]，计测病斑面积。抗病再生株频率是指孢子侵染后的病斑面积降低 20％以上的植株占测定总株数的百分率；抗(R)、中(I)、感(S)的标准见参考文献[2]。

二、结　　果

1. 再生株形态畸变的类型和频率

第一次再生株的形态畸变大致有 3 类（表 1），占总株数的 34－36％，Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类各占 8％、10％、17％；64－66％的植株正常。

2. 形态畸变与毒素胁迫的关系

毒素胁迫愈伤组织可明显提高再生株的形态畸变比率（表 2）。无胁迫时再生株形态畸变率为 10－12％，经一轮、二轮胁迫的畸变率达 25－27％和近 60％。但品种 NC89 的 CA 即使经两轮毒素胁迫，再生的植株仍有 41％正常。

3. 形态畸变在抗病再生株中的发生频率

从表 3 看出，再生株形态畸变的频率与抗病性呈明显的正相关关系，抗病再生株的形态畸变率为 53－60％，抗病性中等的畸变率仅为 28－32％。但在抗病再生株中，仍有 40－47％的植株正常。

表 1　烟草再生植株形态畸变的类型和比例

Table 1　Types and frequencies of deformed plants in the first clones of regenerated tobaccos

烟草品种	再生株数	畸　变　类　型	株　数	比 率(％)
NC89	118	正常株	78	66.1
		Ⅰ类：节间变长，叶狭长或宽短	10	8.5
		Ⅱ类：节间变短，叶狭长或宽短	10	8.5
		Ⅲ类：叶片皱缩	20	16.9
ZY86	158	正常株	102	64.6
		Ⅰ类畸变	12	7.6
		Ⅱ类畸变	17	10.8
		Ⅲ类畸变	27	17.1

表 2 从不同胁迫处理的愈伤组织再生的植株形态畸变情况

Table 2 Deformation frequency of regenerated plants(RPs) from different calli of AT-toxin stress selection

烟草品种	胁迫轮数[1]	再生株数	正常株		畸变株	
			株 数	比 率(%)	株 数	比 率(%)
NC89	0	20	18	90.0	2	10.0
	1	59	44	74.6	15	25.4
	2	39	16	41.0	23	59.0
ZY86	0	25	22	88.0	3	12.0
	1	80	58	72.5	22	27.5
	2	53	22	41.5	31	58.5

1) 0,愈伤培养不加毒素;1,培养基中加 60%(v/v)毒素;2,继 60%毒素胁迫筛选后,再经 75%毒素协迫培养。

表 3 不同抗病水平的再生株形态畸变情况

Table 3 Deformation frequency of regenerated plants(RPs) with different level of resistance to brown spot

烟 草 品 种	抗 性 水 平[1]	再 生 株 数	正常株		Ⅰ类畸变		Ⅱ类畸变		Ⅲ类畸变	
			株 数	比率(%)	株 数	比率(%)	株 数	比率(%)	株 数	比率(%)
NC89	R	10	4	40.0	0	0	4	40.0	2	20.0
	I	61	44	72.1	6	9.8	2	3.3	9	14.8
	S	1	0		0		0		1	
ZY86	R	15	7	46.7	0	0	5	33.3	3	20.0
	I	83	57	68.7	6	7.2	6	7.2	14	16.9
	S	2	0		1		0		1	

1) R、I、S 指抗、中、感。

4. 再生植株的生长发育和抗病性

对再生植株在花盆中生长情况的观察表明,畸变株与正常株的差异至少保持到 7－9 叶期。NC89-TT 的获得除经过对 NC89 第一代再生株的抗病性鉴定外,还在三角瓶内的原生苗阶段和悬滴接种赤星菌孢子前对形态畸变株作了两次汰除。表 4 的结果表明,汰除形态畸变后保留下来的再生株可与正常株同步完成生长发育和生殖阶段,形成果实的能力虽然明显降低,但种子发芽能力与 NC89 相同;NC89-TT 无论对 AT 毒素还是对孢子侵染都表现出很高的抗性。

表 4 汰除形态变异株后烟草再生株生长发育和抗病情况

Table 4 Development and the disease resistance of regenerated tobacco after removing deformed plants

烟苗	生长势[1)]		结籽能力[2)]		种子发芽率(%)	抗病株频率[3)]			抗性水平(%)	
	1	2	1	2		1	2	3	抗毒素	抗孢子侵染
NC89	12 −14	7 −8	40	13.5	100	8	0	0	CK	CK
NC89 -TT	12 −14	7 −8	16	7.5	100	16	16	100	64.1	92.0

1) 1、2 指移栽 60 天时株高(cm)、叶数。2) 1、2 指单株果实数、百果重(g)。3) 1、2、3 指测定总株数、抗病株数、抗病株数/总株数(%)。

三、讨 论

植物体细胞无性系变异(SV)是产生新的抗病基因源并使它易于利用的一种植物基因组分变异，病原物致病因子(如毒素)的胁迫有增加抗病变异频率、提高变异程度、定向选择抗病性变异系的作用[6,7]。但 SV 本身既有抗病性增强等符合人们要求的变异，也有多种不良变异，而且不良变异可为毒素作为诱变因子的作用所增加[7]。抗病性定向筛选的作用就有 3 方面：选出抗病的变异系；保持起始材料原有的好性状；汰除变异带来的不良性状。本研究以两个品种为材料对再生植株形态变异的类型作了定性和定量描述，它成为在原生苗和移植苗抗病性鉴定前两个阶段汰除形态畸变株的依据，并已被扩展应用到其它品种(NC82、K326)中[8]。

AT 毒素的抗性诱导作用[9]是通过它作为生物化学的一个单因子与寄主植物受体分子专化性结合实现的[10]，理论上应该能够定向地诱导体细胞抗病性增强的变异并同时使其它不良变异得到控制，但研究结果是：再生植株形态畸变与抗病性增强的变异之间、它们与毒素胁迫的程度之间呈正相关趋势。这种现象在其他病害中也是常见的[7]，其可能的原因有二：畸变来自 SV 本身的不良变异；主要通过基因突变起作用的毒素胁迫同时对控制其他性状的基因发生影响。根据前人对其他病害的研究[6]，与抗病性的稳定和分化一样，形态畸变在再生株后代中有可能继续表现出来。但从原生苗一开始就汰除不良的形态变异株，选留形态正常的抗病株，不论其后代如何遗传、分离，所冒的风险总是要小些。

参 考 文 献

[1] 董汉松、卢培秀、杨合同，根据植物-病原物互作控制烟草赤星病的途径. 山东科学，1993，**6**(2)：1—9。

[2] 董汉松等，AT 毒素胁迫的再生烟草及其后代对赤星病的抗性，植物保护学报，1995，**22**：321—326。

[3] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力测定方法的研究，山东农业大学学报，1989，**20**(4)：1—8。

[4] 颜昌敬，植物组织培养手册，上海：上海科学技术出版社，1990，254—256，458—463。

[5] 董汉松等，赤星菌毒素对烟草致病特性的研究，山东科学，1993，**6**(2)：39—46。

[6] 董汉松等，烟草抗病基因源的利用与抗病育种策略，山东科学，1993，**6**(2)：53—60。

[7] Wernsman, E. A., Germplasm sources and breeding strategies for developing tobaccos with disease and pest resistance. CORESTA Inf. Bull. CORESTA Symp. 1990. Kallithea: CORESTA Council, 1990, 55－84.
[8] 卢培秀、董汉松等，AT毒素胁迫体细胞诱导烟草抗赤星病的研究：2. 从抗病愈伤组织再生抗病植株，本书。
[9] 董汉松、于建立，赤星菌弱毒株TBA16对烟草抗赤星病诱导作用条件的研究，植物保护学报，1993，**20**：129－134。
[10] 董汉松、卢培秀，寄主植物对真菌毒素专化性反应的分子生物学，山东省自然科学研究进展，中国科学技术出版社，1993，122－128。

INDUCTION OF TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT *VIA* SOMACLONE STRESS WITH AT-TOXIN: 3. DIRECTED SELECTION FOR THE DISEASE RESISTANCE

Dong Hansong, Lu Peixiu, Liu Aixin,
Sun Yankun, Wang Zhifa and Zheng Jifa

Accompanying the induction of tobacco resistance to brown spot by the plant callus stress with AT-toxin of *Alternaria alternata*, present in the regenerated plants were 3 types of morphological deformation, which were extended internode, elongated and narrowed (EN) or shorted and widened (SW) leaves (Type 1), shortened internode and EN or SW leaves (Type 2), and wrinkled leaves (Type 3), at 8%, 10%, and 17% respectively, with a total frequency of 34—36%. Deformation frequencies of the regenerated plants were related to the used calli. The 10—12% deformed plants were originated from the callus cultured without toxin stress, while 25—28% and near 60% were from calli obtained in one stress circulation by 60% toxin and obtained in 2 stress circulations by 75% following 60% toxin pressuring. Positive correlation was between deformation frequency and the disease resistance of regenerated tobacco. Frequencies of morphological deformation of 15—17% and 20% were in the resistance-enhanced plants and in the resistance-unimproved plants of regenerated tobacco. The deformed regenerated plants were removed at proto-seedling stage in flask and at pot-growth stage before their resistance to brown spot was tested. A resistant somaclone was obtained from cv NC89 and named as NC89-TT which showed normal development and reproduction, and 64% and 92% increased resistance respectively to AT-toxin damage and infection by spores of the pathogen.

AT 毒素胁迫体细胞诱导烟草抗赤星病的研究：4. 抗病性在再生株及其后代中的表现

董汉松　刘爱新　孙衍坤　陈建文

从已获得的研究结果看，在利用诱导抗性控制烟草赤星病的 5 种可能的途径[1,3]中有两条途径已显示出希望：由病菌(*Alternaria alternata*)弱毒株 TBA16 制成的灭活孢子制剂在田间表现出控制赤星病、改善烟叶品质等多种有益作用[3]；从体细胞无性系变异(SV)出发改造烟草抗病性的研究[4]已获得抗赤星病的再生植株和种子。以 SV 为根据的抗病性诱导按两条路线进行：用赤星病的 AT 毒素胁迫体细胞；经不同因子诱导的抗病性通过组织培养向再生植株转移[3]，本文是前一方面的主要结果(1993 年进行研究)。

一、材料和方法

1. 材料

(1) 烟草品种：烤烟品种 NC89、NC82、K326 是目前我国种植面最广的优质、感病品种，种子由本实验室繁殖保存；品种中烟 86(ZY86)对赤星病抗性较强，用作参比，种子由中国农业科学院烟草研究所提供。

(2) 菌株：制备 AT 毒素和接种烟苗的赤星菌菌株都是 TBA28。

(3) 培养基：诱导愈伤组织、生芽、生根的培养基分别用 MS-11、MS-3、MS-43，愈伤组织继代培养基用 MS-2[8]；在毒素胁迫筛选时定量加入 AT 毒素经高温蒸汽灭菌(121℃，20 分钟)后使用。

(4) AT 毒素：用的是粗毒素，原液按董汉松等(1993)[5]的方法制备，经高温蒸汽灭菌后置 0—4℃下保存备用。

2. 再生植株产生的过程和方法

(1) 抗毒素愈伤组织(CA)的诱导：从 3－4 叶期烟苗心叶取叶碟(0.5×0.5cm)，在 MS-11 上培养(25－28℃、相对湿度 50%±、光/暗周期 16 小时/8 小时、光强 1000－1500lux)，每 21－28 天继代一次。第二、三次继代的 CA 转入第一轮抗毒素(60%，v/v)筛选，存活下来的 CA 再移入不含毒素的 MS-2 上培养 28 天后进入第二轮抗毒素(75%、v/v)筛选。两轮抗毒素 CA 筛选都以不加毒素的 MS-11 同样处理为对照。

(2) 芽的诱导：将第一、二轮筛选得到的 CA 移到 MS-3 上，按与上相同的条件培养，至长出芽点时再移植一次，然后等芽长到 1－2cm 高时转入生根诱导。

(3) 生根诱导和移栽：芽段在 MS-43 培养基上培养(条件同上)约 28 天根系发育完成，继续培养到原生苗 3－5 叶时移入花盆(12×12cm)生长。

3. 抗病再生株种子的获得

经病菌孢子悬浮液悬滴接种验证后，从抗病性提高50%以上的NC89一次再生株取叶碟，按与上相同的步骤再生植株、移栽，再生苗长到4—5叶期转入大花盆(23×23cm)培育到结籽，所得种子编号为NC89-TT，保存在山东农业大学烟草研究室。

4. 抗病性测定

(1) 幼苗对AT毒素的反应：用粗毒素按浸根法[5]测定NC89-TT幼苗的抗毒素能力，以普通培育的NC89苗为对比。取2—3叶的幼苗40株，分置于10个青霉素小瓶(洗干净，已装入毒素液4ml)，25℃±下定期观察病变，并于48小时计测病情指数。

(2) 成苗对赤星病的反应：再生植株一代和二代苗均在9—10叶期按孢子液(10^5孢子/ml)悬滴法接种第5、6真叶(每叶4—6滴)，根据正常生长的再生株数量接种12—50棵烟苗，各以普通栽培的同叶期烟苗(6—12株)同样接种为对照，发病后测定病斑直径。检查时对一代再生株着重抗病性增强的比例，对二代再生株则注意病害降低的程度。

二、结　　果

1. 抗毒素愈伤组织的产生及抗性的稳定性

表1的结果说明了两点：抗毒素CA产生的比率在品种间有明显差别；第一轮筛选出的抗毒素CA在高浓度毒素胁迫的第二轮筛选中仍以很高的比率被杀死，从第一轮到第二轮死亡的CA最高达96%。但在第二轮筛选后获得了足够芽诱导用的CA，同时，当这些抗毒素CA被置于不含毒素的MS-2培养基上低温(0—4℃)保存84天后，重新转入含毒素75%的培养基中培养时，存活率仍达100%。

表1　抗毒素愈伤组织(CA)的筛选情况

Table 1　Selection of the resistant calli with AT-toxin stress

烟草品种	供选CA块数	第一轮筛选(60%毒素)		第二轮筛选(75%毒素)	
		存活CA块数1)	存活率(%)	存活CA块数	存活率(%)
NC89	75	14	18.7	3	4.0
NC82	80	15	18.8	3	3.8
K326	60	25	41.7	8	13.3
ZY86	60	30	50.0	10	16.7

1) 全部转入第二轮筛选。

2. 抗病再生株的产生及抗性的稳定性

从抗毒素CA可以获得不同比例的抗赤星病的一次再生植株(表2)。与普通栽培的植株相比，再生株对赤星病的反应有3种情况：抗性明显提高的、基本保持起始材料(来源品种)原有水平的、明显降低的。这3类植株的多少与使用的CA相关，经两轮毒素胁迫筛选的CA可以再生出40%以上抗病性增强的植株，比一轮筛选的高30%以上，同时，抗病

性未得到改变或降低的再生株减少 40%以上。其中有一点值得注意：无毒素胁迫的 CA 再生的植株 95%以上保持起始材料的原有抗病水平，并有少数抗病性降低的再生株产生。

表 2 从不同愈伤组织(CA)再生的植株对赤星病的反应

Table 2 Brown spot resistance of regenerants from different calli

叶碟来源品种	CA 筛选次数[1]	再生总株数	抗病[2]		中等[2]		感病[2]	
			株数	比率(%)[3]	株数	比率(%)	株数	比率(%)
NC89	0	20	0	0	19	95.0	1	5.0
	1	33	2	6.3	31	93.1	0	0
	2	19	8	42.1	11	57.9	0	0
ZY86	0	25	0	0	24	96.0	1	4.0
	1	50	4	8.0	45	90.0	1	2.0
	2	25	11	44.0	14	56.0	0	0

1) 指抗毒素 CA 筛选。"0"指培养基中不加毒素。

2) 与普通栽培的植株比，"抗病"、"中等""感病"指病斑面积小 20%以上，增或减 20%(系统误差，参见文献[5])、增 20%以上。

3) 与总株数相比。

为测定一次再生株抗病性是否稳定并进而获得抗病的种子，从抗病性提高(病斑面积降低)50%以上的再生株上取叶碟重复 CA 毒素胁迫培养程序，结果(表 3)是，来自抗病再生株的 CA 在毒素含量 60%时有 75－80%、毒素含量 75%时有 63－69%的组织块存活下来；对存活下来的抗毒素 CA 诱导再生后，所有二次再生株抗病性都明显提高，抗性提高的植株比例较第一次再生植株(表 2)增加 60%；由这些植株获得的种子(NC89-TT)将转入进一步测定。

表 3 抗病再生株的 CA 及其再生苗对 AT 毒素和赤星病的反应

Table 3 Responses to AT-toxin and infection of the first progeny of tobacco regenerants

烟草品种	叶碟来源	在 60%毒素培养基上			在 75%毒素培养基上			二次再生株抗病性[1]	
		供试 CA 数	存活 CA 数	存活率 (%)	供试 CA 数	存活 CA 数	存活率 (%)	测定株数	抗病株数
NC89	再生株	12	9	75.0	16	10	62.5	16	16
	普通株	16	3	18.8	14	2	14.3	20(8)[2]	6(0)
ZY86	再生株	15	12	80.0	13	9	69.2	未	测
	普通株	14	7	50.0	10	3	30.0		

1) 植株均由上一次再生株的叶碟再生，在 5－7 叶期悬滴接种孢子；"抗病"标准同表 2。

2) 括号外、内数字分别是普通株的再生株和普通栽培的植株的测定值。

3. 抗病性在再生植株第二代上的表现

从二次再生的 NC89 抗病植株获得 NC89-TT 的种子后，第二代植株显示出抗 AT 毒

素和抗病菌孢子侵染的能力。

在抗毒素方面的表现(表 4)是:由毒素引起的幼苗早期病变发生时间晚、程度低,一半以上再生株根部变褐、叶片萎蔫比 NC89 普通株至少晚 8 小时发生、受害程度比普通株低 30—60%,须根脱落的差别更为明显;从 48 小时的发病差别看,NC89-TT 幼苗较 NC89 幼苗受害程度降低 64%。

表 4 品种 NC89 和其再生株二代(NC89-TT)苗对 AT 毒素的反应

Table 4 Responses to AT-toxin of the second progeny (NC89-TT) of tobacco regenerants

幼苗类别	根部变褐		叶片萎蔫		须根脱落			48 小时发病程度	
	时间(小时)	比例(病变株数/总株数)	时间	比例	时间	比例	脱落量(%)	病情指数	病情指数降低(%)
NC89	12	21/40	20	32/40	20	15/40	<5	48.8	64.1
	20	40/40	36	40/40	48	40/40	>30		
NC89-TT	12	3/40	20	20/40	20	0/40	0	17.5	对照
	20	27/40	36	25/40	48	18/40	<10		

成长苗经病菌孢子接种后,NC89-TT 表现出抵抗病菌侵入和限制病斑扩展两种能力,与 NC89 比,位点侵染率降低 60%以上,病斑面积减小 92%(表 5)。

表 5 品种 NC89 和其再生植株(NC89-TT)二代对赤星病的反应

Table 5 Resistance of NC89-TT to brown spot

植株类别	抗侵入			抗扩展	
	接种点数	发病点数	比率(%)	病斑面积(mm^2)	降低(%)
NC89	24	20	83.3	8.97	对照
NC89-TT	24	5	20.8	0.72	92.0

三、讨 论

1. 本研究的实际意义

中国烟区是世界上烟草赤星病发生最广、危害最重的烟区,没有自己的优质抗病品种体系是一个主要原因[3,4]。引进的 NC89、NC82、K326 已成当家品种,它们烟叶品质好,但高感赤星病(结果是烟叶受卷烟厂欢迎,但烟农经济收益低),对其抗病性进行改造显得十分必要。在国内还没有理想的替代品种、传统育种法周期长并难以兼顾对抗病性与其他性状的同时改造[11],也还未找到可借基工程技术改良抗病性的目的基因[1]等情况下,体细胞无性系变异(SV)途径就有它现实的可行性,前人已有利用 SV 途径在 3—5 年内成功地改造烟草对一个病害抗性的例子[4,11])。

2. 关于 NC89-TT 及其品种化

本文重点说明了品种 NC89 抗病再生株的产生和测定过程,这是依 SV 途径加 AT

毒素胁迫改造烟草对赤星病的抗性的一个基本程式。所获再生植株具有抗毒素和抗病菌孢子侵染的能力，这种抗性可经过种子在二代植株中表达；同时，对孢子侵染的抗性除了限制病斑扩展外，还可抵抗病菌的侵入，这是以前所测诱导抗性不具有的作用[7]。把NC89-TT 引向品种化的研究还要解决一系列问题：抗病性在田间的稳定表现；其他好性状的保持；对其他病害的抗性；完成这些目标后 NC89 原有好性状是否再为卷烟工业所需要等。

3. SV 的其他路线及有关问题

利用诱导抗性控制植物病害的途径能否达到实用目的，关键取决于这种途径是否根据植物-病原物互作规律来选择。例如，病菌弱毒株孢子制剂(1993 年田间防病效果可达80%以上)是基于孢子壁上含有激发子功能的物质这一假设[7]。对 SV 途径，从理论上看有 3 条路线都是可行的：①毒素胁迫抗病性；②SV 本身包括抗病性增强的变异[4,11]；③诱导抗性通过组织培养向再生植株转移[9]。AT 毒素作为识别因子与寄主细胞膜上受体分子的专化性结合[2,10]，使它在生物化学上以一个单因子的作用有效地诱导烟草的抗病性，但用作胁迫选择的因子有时会使 SV 自身发生的抗病性增强的变异被陶汰掉(参见表2、表 3)。对这些问题的了解会使诱导抗性的利用更有目的性、更有效。

参 考 文 献

[1] 董汉松，植物诱导抗性的机制和应用前景，植物抗性生理研究(赵可夫主编)，山东科学技术出版社，1992，193－201。

[2] 董汉松，寄主植物与病原微生物间的相互识别，农业生物技术进展与展望——国家 863 计划生物技术领域第一主题学术研讨会论文选编'92(贾士荣主编)，1993，65－79，中国科学技术大学出版社。

[3] 董汉松，根据植物－病原物互作控制烟草赤星病的途径，山东科学，1993，**6**(2)：1－9。

[4] 董汉松等，烟草抗病基因源的利用与抗病育种策略，山东科学，1993，**6**(2)：53－60。

[5] 董汉松等，赤星菌毒素对烟草幼苗致病特性的研究，山东科学，1993，**6**(2)：39－46。

[6] 董汉松等，烟草赤星病损失估计模型的建立方法，中国烟草学报，1993，**1**(4)：66－69。

[7] 董汉松等，三类因子在烟草抗赤星病诱导中的作用，山东科学，1993，**6**(2)：47－52。

[8] 颜昌敬，植物组织培养手册，1990，254－256；458－459，上海科学技术出版社。

[9] Kuc，J. Expression of latent mechanisms for resistance to blue mold and other disease in tobacco. In：CORESTA Inf. Bull.，9th Tob. Sci. cong.，1988，25－43.

[10] Nishimura，S. et al.，Molecular Determinants of Plant Diseases.，1987，127－144. Jpn. Sci. Soc.，Springer-Verlag.

[11] Wersman，E. A.，Germplasm sources and breeding strategies for developing tobaccos with disease and pest resistance. CORESTA Inf. Bull. CORESTA Symp. 1990，Kallithea，1990，55－84.

INDUCTION OF TOBACCO RESISTANCE TO BROWN SPOT *VIA* SOMACLONE STRESS WITH AT-TOXIN:4. RESISTANCE EXPRESSION IN REGENERATED PLANTS AND THEIR SOMACLONE PROGENIES

Dong Hansong, Liu Aixin, Sun Yankun and Chen Jianwen

For improving tobacco resistance to brown spot through somaclonal induction pressured by AT-toxin of *Alternaria alternata*, three cultivars of flue-cured tobacco which are excellent in quality properties and susceptible to the disease in China, were selected as target materials, with the cross reference of ZY86, a native cv which is undesirale in quality and more resistant to the disease. After calli from heart leaves of the plants were induced, they were pressured with AT-toxin in 2 selection circulations, in which 60% and 75% (v/v) toxin contents were mixed into the stress medium in the lst and 2nd circulation, and calli with toxin resistance were obtained at 3.8—16.7%. The first clones of regenerated plants were acquired from the toxin-resistant calli and showed enhanced resistance to the toxin damage and infection by conidia of the pathogen. Frequency of resistant regenerated plants was related to the callus sources. Lower than 8% and more than 40% regenerated plants with resistance increase were originated from one and two circulation-selected calli when they had been selected for toxin resistance. The second clones of calli from the first clones of regenerated plants showed resistance to AT-toxin at frequencies of 19—80% and 14—69% when the toxin contents were 60% and 75%. The second clones of toxin-resistant calli were used for inducing the second clones of regenerated plants which occurred at a 100% rate in cv NC89. The second clones of regenerated plants of NC89 was named as NC89-TT. Progeny seedling from NC89-TT gave 64% and 92% reduction of damage by AT-toxin and infection by spores of the pathogen.

烟草赤星菌菌丝体和孢子的小规模生产

刘伯新　刘广玉　范洪慈　张留义
卢绪京　李振喜　王智发　董汉松

在我们对烟草赤星病和烟草诱导抗病性的研究中，无论是病原生物学、病理学还是用抗病性诱导剂(SRS2)防治赤星病的研究，都需要依不同目的获得病菌的接种体及用于SRS2制备和有关诱导抗性机制研究的菌丝体和孢子，本文是针对不同目的对这些方面进行研究的结果(1989—1994年进行研究、完善)。

一、材料和方法

1. 平板培养

(1) 供试菌株：共测定分别属于3个种的21个菌株(表1)。

(2) 供试培养基：共11种，pH均调至5.5。①马铃薯蔗糖琼脂培养基(PDA)[1]；②蔬菜混合煎汁琼脂培养基(VVA)：

菠菜叶	30g	小青菜叶	30g
芹菜叶	30g	大白菜芯	30g
藕　片	30g	琼 脂 粉	17g

先将以上5种蔬菜叶组织剪成小块，加约800ml蒸馏水煮沸1小时，经双层纱布过滤，滤液内加琼脂煮溶，最后加蒸馏水补足1 000ml，同时将pH调到5.5。③牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NBA)[2]；④玉米粉琼脂培养基(Co)[1]；⑤滤纸浆琼胶培养基(FPA)：

定性滤纸片	30g	蛋白胨	10g
琼脂粉	17g	蒸馏水	1000 ml

先将9cm定性滤纸剪成小片，加500ml蒸馏水浸泡，并用组织捣碎器搅成匀浆；然后补足蒸馏水并在煮沸中加蛋白胨和琼脂粉。⑥ 麦芽糖琼脂培养基(MA)：

麦芽糖	10g	琼脂粉	17g
蛋白胨	10g	蒸馏水	1 000g

⑦ 烟叶煎汁琼脂培养基(DTLA)：

干烟叶	150g	琼脂粉 17g
蒸馏水	1 000ml	

先将烟叶粉碎并加约800ml蒸馏水煮沸1小时，经双层纱布过滤后对滤液补加蒸馏水到1000ml，在煮沸中加琼脂粉。

⑧ 蔗糖琼脂培养基(ZA)：

蔗　糖	10g	蛋白胨	10g
琼脂粉	17g	蒸馏水	1 000ml

⑨葡萄糖琼胶培养基(GA)：

葡萄糖 10g 蛋白胨 10g

琼脂粉 17g 蒸馏水 1 000ml

琼脂粉 17g 蒸馏水 1 000ml

⑩ 查彼培养基(Cz)[1]；⑪燕麦片琼脂培养基(OA)[1]。

表1 供试菌株及其来源

Table 1 The tested strains and their sources

菌 株	学 名	分离寄主	分离地点
TBA4	*Alternaria alternata*	烟草	福建 龙岩
TBA6	*A. alternara*	烟草	山东 泰安
TBA9	*A. alternata*	烟草	福建 龙岩
CCA1	*Alternaria* sp.	黄瓜	山东 泰安
SA1	*A. solani*	番茄	山东 枣庄峄城
TBA10	*A. alternata*	烟草	山东 临朐
TBA11	*A. alternata*	烟草	山东 安丘
TBA12	*A. alternata*	烟草	山东 沂水
TBA14	*A. alternata*	烟草	山东 沂水
SA2	*A. solani*	茄子	山东 平阴
TBA15	*A. alternata*	烟草	云南 玉溪
TBA17	*A. alternata*	烟草	山东 临朐
TBA19	*A. alternata*	烟草	云南 玉溪
TBA20	*A. alternata*	烟草	山东 青州
TBA22	*A. alternata*	烟草	山东 平邑
TBA24	*A. alternata*	烟草	山东 平邑
TBA25	*A. alternata*	烟草	山东 平邑
TBA27	*A. alternata*	烟草	山东 昌乐
TBA28	*A. alternata*	烟草	山东 昌乐
TBA33	*A. alternata*	烟草	山东 昌乐
TBA34	*A. alternata*	烟草	山东 昌乐

(3) 培养与检测：供试的 21 个菌株均在各培养基平板上于 25℃下生长 5 天，然后移至 15℃下继续生长 7 天，在这二个时期作检测。试验设计为每培养基每菌株各 3 次重复(3 皿)，试验结果为统计 3 次重复的均值。检测项目包括菌株生长能力，即单位时间内菌落扩展面积与气生菌丝高度，产孢能力，以及菌落在各种培养基上的生长特性。

2. 液体发酵

(1) 供试菌株：赤星菌弱毒株 TBA16[3]。

(2) 培养基：共 10 种，均用 0.2mol/L，pH7.0 的磷酸缓冲液配制，以下加料量的溶液

总体积按 1 000 ml 计。

①马铃薯-蔗糖培养液(PDS):马铃薯　200g　食用白糖　5g

制备方法与 PDA[1]同,仅不加琼脂。

②玉米粉-蔗糖培养液 1(CP1):玉米粉　10g　食用白糖 5g

③CP2:玉米粉　5g　食用白糖　5g

④大豆粉-蔗糖培养液 1(BP1):大豆粉　10g　食用白糖　5g

⑤BP2:大豆粉　5g　食用白糖　5g

⑥烟秆粉培养液 1(DTLA1):烟秆粉　15g　食用白糖　5g

⑦ TX2:烟秆粉　10g　食用白糖　5g

⑧TX3:烟秆粉　5g　食用白糖　5g

⑨马铃薯糊-蔗糖培养液 1(PD1):马铃薯　100g　食用白糖　5g

⑩ PD2:马铃薯　50g　食用白糖　5g

⑨和⑩是将马铃薯煮熟后研糊。以上各培养液灭菌等处理方法同常规。

(3) 培养与检测:各培养液 50ml(250ml 三角瓶内)接菌圆片后在 25℃±下振荡培养(速度为 200r/min)3 天;过滤,80℃下烘干,称重。

3. 浅盘固体发酵

(1) 供式菌株:TBA16。

(2) 培养基:3 种,加料和 1/3 体积的水混匀,灭菌后备用。①烟秆粉-蔗糖培养基(S-TX),二者用量比为 2∶1;②玉米粉-豆粉-蔗糖复合培养基(MBS),三者比例为 10∶1∶0.1;③烟秆粉-玉米粉-蔗糖复合培养基(TMS),10∶5∶0.1。

(3) 培养与检测:菌株 TBA16 先在 PDA 平板上培养 7—10 天(25℃±)至孢子长满平板,用灭菌水洗出孢子制成接种悬浮液(约 10^{10}孢子/ml),用喉头喷雾器均匀喷到装进了培养基的瓷盘(24cm×16cm×4cm);瓷盘内培养料加到盘高的 1/2,使用前高压蒸汽灭菌。浅盘接菌后在 25℃±下培养 7—10 天至目测已长满大量孢子。培养物加 2 倍体积的蒸馏水搅拌,过三层纱布;滤液离心(4 000g)20 分钟;取沉淀的孢子,80℃下烘干,称重。

二、试验结果

1. 平板培养

(1) 不同菌株在各种培养基上的生长特征:21 个菌株在 11 种培养基上菌落特征有 4 个类型:①白色菌落,整个菌落只生长白色气生菌丝;②黑色菌落,菌落全部或大部呈黑色;③黑白相间型,菌落的白色和黑色部分呈同心轮纹状相间排列;④黑白相杂型:在菌落的同一平面上间有白色菌丝和黑色部分。

病菌在平板上生长的另一个特征是形成同心轮纹菌落。观察发现有 16 个菌株在 8 种不同培养基上产生此类菌落(表 2)。菌落的同心轮纹数在培养 5 天后为 4—10 轮不等,继续培养 7 天后增加到 4—14 轮(表 2)。

此外,在 FPA(滤纸浆琼脂)培养基上,所有菌株产生的菌落均呈下陷状,下陷深度为 0.2—0.3cm。

（2）菌落生长和产孢能力的定量：生长量按菌落面积和气生菌丝高度计，产孢量可用色差目测法，表 3 是目测等级，与镜检测定相吻合（表 4）。

（3）培养基类型划分：所测 11 种培养基可被分为以下 4 种情况。①宜于产孢的培养基：有 OA、FPA、VVA3 种。②宜于生长菌丝的培养基：有 MA、Co、GA3 种。③中间型培养基：包括 NBA、PDA 和 DTLA。④不适宜型培养基：有 Cz 和 ZA 两种。

2. 菌丝体和孢子的室内小规模生产

（1）液体振荡培养生产菌丝体：从表 6 可见，在液体培养中赤星菌弱毒株 TBA16 几乎不形孢子或孢子很少，主要是生长菌丝体。菌丝干物质产量在培养基间差别明显，以 CP1 最好。

（2）浅盘发酵生长孢子：表 7 是菌株 TBA16 在浅盘发酵一个周期后的孢子产量，表明在培养基 MBS 上产量最高。

三、讨　　论

1. 关于赤星菌的培养生物学

平板培养的研究结果明确了烟草赤星病菌在培养条件下生长的生物学特性以及生长量和产孢量在菌株和培养基间的差异。首先，病菌在培养基上形成同心轮纹状菌落这一现象，说明病菌的菌丝生长和产孢作用是一个交替发生的过程。明确这一特性，有助于病菌生物学的研究和接种物制备时间的确定。第二，标准化定量法是研究病菌生长、产孢和致病力等性状的必要方法[4]，本文建立的病菌产孢量的等级，反映了病菌产孢能力的量和梯度关系，为病菌生物学比较研究与产孢量和致病力之间相互关系的确定提供了标准。最后，关于病菌不同菌株间产孢能力的差异表明了病菌变异的一个重要方面[5]，而产孢能力在培养基间的差异在很大程度上与前人的研究结果相符。本文表明，OA、FPA 和 VVA 可促进病菌大量产孢，MA、Co 和 GA 则有利于菌丝生长，而 Wilson 指出当用单糖做碳源时不利于产孢[6]，本文与此一致。不同的是，Wilson 指出用干烟叶煎汁做碳氮源可促进产孢和生长[6]，而本文中 DTLA 对生长和产孢都不具明显的促进作用。此外，本文所述不同菌株在 PDA 上表现中等的菌丝生长和产孢能力，这与 Whipps 等[7]和 Tay[8]所提出的结论相一致，他们的试验表明 PDA 并不总是给予真菌以最大的产孢量与生长量。

2. 关于赤星菌弱毒株 TBA16 的菌丝和孢子生产及用途

液体通气培养主要是生产菌丝体，使用 CP1 和 CP2 培养液可获得 30%的干物质。本文所述实验室规定的菌丝体生产主要用于制备以后研究中将用到的激发子；如果用于制备 SRS 制剂，需要在此小规模生产与发酵罐生产之间作诸如通气量、投料量、发酵时间等的转换计算和试验。

浅盘发酵用于生产孢子的效率较高，使用 MBS 培养料可获高达 76%的生产率。发酵产生的孢子可作各种用途，如我们已做的制备激发子和 SRS 制剂、以及最通常的接种试验等。这种发酵法规模可大可小，完全可以根据空间大小设计，也不需在投料量、发酵的时间上作调整。

表 2 几个菌株在不同培养基上同心轮纹状菌落的生长情况

Table 2 Growth and colony types of the fungi on different media

菌 株	在不同培养基上菌落成圈生长的轮数															
	OA		GA		Co		VVA		DTLA		ZA		PDA		Cz	
	5天	12天	5天	12天	5天	12天	5天	12天	5天	12天	5天	12天	5天	12天	5天	12天
(6)	—[1)]	5	—	—	2	5	2	3	—	—	—	—	—	—	—	—
(9)	—	—	3	7	—	—	—	—	—	—	2	5	—	—	—	—
(10)	—	3	—	—	2	5	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—
(11)	—	5	—	5	—	4	2	5	—	2	—	—	—	—	—	—
(14)	—	—	—	—	—	4	—	4	—	—	—	3	—	—	—	—
(16)	—	4	3	7	2	5	2	3	—	4	—	4	—	4	—	—
(17)	—	4	—	4	—	—	2	5	—	—	2	5	—	4	—	—
(18)	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	2	6	—	—	—	2
(25)	2	5	—	—	2	3	2	5	—	—	—	—	—	—	—	—
(27)	2	5	3	6	—	4	2	4	—	—	—	4	—	4	—	—
(29)	—	—	2	5	—	—	—	3	—	—	—	3	—	4	—	—
(30)	—	4	2	5	2	3	2	4	—	—	—	—	—	—	—	—
(32)	2	5	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—
(33)	—	4	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—
(38)	—	—	—	4	—	3	—	—	—	—	2	5	—	3	—	—
(39)	2	5	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

1)"—"表示不呈同心轮纹状;表中数字为黑轮数。

表 3 按色差确定的产孢量目测等级分级标准

Table 3 The quantitative test of sporulation class of the fungi

等 级	菌 落 生 长 状 况	代表值
0	菌落全部为白色	0
0.5	菌落灰白色	0.5
1.0	菌落间生黑、白部分,黑色部分占 1/2 以下	1.0
1.5	菌落以淡黑色为背景色,杂生白色菌丝	1.5
2.0	菌落以黑绿色为背景色,轮生或杂生白色菌丝	2.0
2.5	菌落全呈淡黑色,透光性强	2.5
3.0	菌落全为黑绿色,对光视透性弱	3.0
3.5	菌落深黑色,透光微弱,黑色,高度 0.5mm 左右	3.5
4.0	菌落深黑色,几乎不透光,黑色高度为 0.5—1.5mm	4.0

表 4　各目测产孢等级经计测的产孢量

Table 4　Relationship between the sporulation class and spore amount

目测等级	单位菌落面积的产孢量(孢子/cm²)	目测等级	单位菌落面积的产孢量(孢子/cm²)
0	3.0×10^3	2.5	2.0×10^6
0.5	5.0×10^4	3.0	3.0×10^6
1.0	1.0×10^5	3.5	4.0×10^6
1.5	5.0×10^5	4.0	5.0×10^6
2.0	1.0×10^6		

表 5　病菌在不同培养基上生长和产孢量的数值区间分布

Table 5　Growth and spotulation amounts of the fungi on different media

测验	数值区间	在各种培养基上的菌株数										
		OA	MA	FPA	NBA	Co	VVA	PDA	GA	ZA	DTLA	Cz
菌落面积[1]	0—10	12	2	21	18	12	7	16	19	21	21	21
	15—30	9	18	0	3	9	14	5	2	0	0	0
	35—50	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
菌落面积增量[2]	0—5	16	21	20	20	17	21	12	15	11	8	10
	10—20	4	0	1	0	4	0	9	6	10	10	9
	25—50	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
菌落高[3]	1—3	12	21	19	18	3	13	4	4	3	16	11
	4—6	9	0	2	3	11	8	12	15	17	5	6
	7—10	0	0	0	0	7	0	5	2	1	0	4
产孢[1]	0—1.0	0	21	7	9	13	3	8	9	7	9	21
	1.5—2.5	3	0	14	12	8	7	6	3	7	6	0
	3.0—4.0	18	0	0	0	0	11	7	9	7	6	0

1) 培养 5 天后的值；2)继续培养 7 天的倍数；
3) 继续培养 7 天后的毫米数。

表 6　赤星菌菌株 TBA16 在不同液体培养基中的生产量

Table 6　Selection of media for the mycelial production

培养基	培养料量(kg)	孢子数[1]	菌丝干重(kg)	菌丝生产率(%)[2]
PDA	5.0[3]	0	1.00	20.0
CP1	15.0	8	4.65	31.0
CP2	10.0	24	2.90	29.0
BP1	15.0	0	1.05	7.0
BP2	10.0	0	1.30	1.30
TX1	20.0	0	0	0
TX2	15.0	36	0.55	3.7
TX3	10.0	28	0.27	2.7
PD1	10.5	0	1.61	15.2
PD2	5.5	4	0.90	16.4

1)是 0.1g 培养物中的孢子数；2)；菌丝重/培养料重；
3)马铃薯的煎汁不计。

表 7　赤星菌菌株 TBA16 在浅盘发酵中的孢子产量

Table 7　The spore production in shallow dish ferment

培养基	发酵批次	投料量(g)	孢子产量(g)	孢子生产率(%)[1]
MBS	1	500	260.0	52.0
	2	400	305.0	76.3
	3	400	300.0	75.0
	平均	433	288.3	66.6
S-TX	1	20	3.0	15.0
	2	20	3.4	17.0
	3	20	3.1	15.5
	平均	20	3.2	16.0
TMS	9	40	4.3	10.8
	2	40	3.2	8.0
	3	40	3.2	8.0
	平均	40	3.6	9.0

1)孢子产量/投料量。

参　考　文　献

[1] 方中达,植病研究法,北京:农业出版社,1979,83－87。

[2] Scchaad, N. W.,Laboratory Guid for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Minnesota: Exp. Ga. for Bac. Commit. of American Phytopathol. Soc.,1980.

[3] 董汉松、王建立,植物保护学报,1993,**20**:129－134。

[4] Harvey W.,Spurr, J. R., J. Agr. Entomol.,1985,**2**:117－122.

[5] Lucas,G. B.,Diseases of Tobacco(3rd ed.),NC:Biol. Consulting Assoc., 1975,267－296.

[6] Wilson J. H.,Thesis,N. C., Stated Univ. Raleigh,NC, 1959,58.

[7] Whipps, J. M.,Mangn, N.,Bull. OEPP,1987,**17**:587－597.

[8] Tay,F. C. S.,Phytopathol.,1983,**73**:234－240.

LABORATORY SCALE PRODUCTION OF MYCELIA AND SPORES OF *ALTERNARIA ALTERNATA* FOR RESEARCH AND PRACTICE PURPOSES

Liu Boxin, Liu Guangyu, Fan Hongci, Zhang Liuyi, Lu Xujing, Li Zhengxi, Wang Zhifa and Dong Hansong

In our researches on induced resistance of tobacco to brown spot, it is proved that the hypovirulent strain TBA16 of *Alternaria alternata* gives the best effect among tested hypovirulent strains to induce the host resistance to the disease. From this hypovirulent

strain, cell walls of mycelia and spores have been extracted and applied to compose the crucial component of a preparation SRS2 which has been tested in the fields and showed satisfactory effects of both the disease control and quality improvement of the cured leaves. The function of disease control of the preparation is ascertained to be contributed by elicitor component in cell walls of the strain TBA16. Coming researches will be to know how the elicitor act is responsible for elicitation of tobacco resistance against brown spot. It is expected to establish a model called "two/way elicitor-receptor interactions". The present paper dealed with the medium selection, and cultural methods and conditions, in laboratory scale, of producing the mycelia and spores which will be frequently used in the practical and theoretical purposes mentioned above.

Production of the two structural components was carried out in 3 scales. The lst scale was tested on petridishes. Twenty-one strains of *Alternaria* spp. including 18 strains of *A. alternata* were used to select the best media from 11 media for the mycelial growth and sporulation which were measured quantitatively. The 11 media were divided into 4 kinds, i. e. suitable for sporulation, suitable for mycelial growth, suitable for both sporulation and mycelial growth, and unsuitable for the both. For each of the 4 kinds, the best medium was determined.

The 2nd scale was liquid culture under aerobic conditions. This was done in a laboratory shaker, to produce mycelia. The hypovirulent strain TBA16 was grown in 10 liquid media for 3 days and tested quantitatively in dry weight. The best medium which gave the highest yield of mycelia and 31% harvest effect (dry mycelial weight to total weight of medium materials) was selected.

The last scale, solid ferment on shallow dishes, was accomplished under disinfected conditions, to ferment the same hypovirulent strain of the pathogen with the special purpose of obtaining its spores. From 3 media tested, the best one was selected and gave 52—76% harvest effects.

赤星菌弱毒株 TBA16 孢子制剂 PCF1 在田间控制烟草赤星病的效果及其他有益影响

董汉松　孙晓平　卜晓东　张留义　张守厚　赵　兵　李振喜　厉启东　林永柱
刘成新　杨举田　孙明业　牛柱峰　尹东升　崔志云　张明圣　宗树林

利用诱导抗性控制植物病害的途径取决于诱导因子的种类和性质，对具有抗性诱导作用的病原物弱毒株的直接应用，是其中比较简便的途径，已有不少成功的例子[3,7]）。对烟草赤星病的这种研究起步较晚，作者最近证明病菌弱毒株可以系统地诱导烟草对赤星病的抗性[3]，其中菌株 TBA16 在适宜条件下显示出很强的抗性诱导能力，并可直接喷洒烟草叶面[5]。这就提出了直接利用的可能性，本文报道研究（1990－1992 年）结果。

一、材料与方法

1. 孢子制剂 PCF1

它由病菌弱毒株 TBA16 的孢子灭活后加浮载剂制成，试验剂型特性为：水悬液；孢子（干重）和浮载剂含量为 1%（W/V）；50ml 瓶装，高压蒸汽灭菌，有效期至少为 20 个月。

2. 温室内测定

所用烟草品种是 NC89。PCF1 按两种方法施于叶面：悬滴接种 9－10 叶期烟苗的第 4、5 真叶；喷洒（3WCS-0.8 型手持压缩喷雾器）同叶期烟苗的全株；第 5 天用病菌强毒株 TBA28 挑战接种倒数 3－5 叶，诱发赤星病[3]；各处理 10 株苗，抗性诱导效应等参数取平均值。

3. 田间试验

1992 年分别在山东沂水（2 亩，烟草品种 NC89）、临朐（4 亩，NC89）、昌乐（7 亩，NC89）、莒县（12 亩，NC82）、沂南（13 亩，K326）5 县设试验点，分 PCF1、菌核净（25%可湿性粉，浙江温州市鹿城植保化学厂产品）、空白对照 3 个处理，前二县不设重复，后三县设 3 重复、随机区组排列。喷雾，用药量为：菌核净，每亩每次 140g；PCF1，每亩每次 500ml；共喷 3 次，第一次时间为 8 月 1－7 日，以后间隔 14－20 天。作如下测定。

（1）病害控制效果：每次喷药后第 10 天按大田病级标准[6]随机调查发病严重度、计算病情指数，防病效果表示为病株率和病情指数降低的百分数。

（2）产量性状：包括 3 项内容：①第一次喷药后约 10 天，即烟草平顶前测量植株高度；②第二、三次喷药后、中上部叶采收前，测定腰叶、上二棚或顶叶部位最大叶的叶面积，统计时加权平均，这两项测定不少于 50 株；③烟叶产量的测定是在每次采收时分处理标记、常规烘烤，最后得到整个试验点的实际产量（kg/亩）。

(3) 烟叶品质性状：包括烟叶内在品质(成分)分析和出售等级、价格评定。成分分析于试验前设定在临朐、昌乐(山东的优质烟区)试验点取上二棚叶，每处理(每重复)1kg 样品，等量混合，送中国农科院烟草研究所中心分析室(国际承认的合法测试单位)测定。烟叶等级和价格是每次标记出售的实际记录值，由此获得上中等烟叶比例、价格(元/kg)、产值(元/亩)的实际平均值。

二、结果与分析

1. PCF1 对烟苗的抗性诱导作用

由表 1 可知，在用悬滴法诱导处理的烟苗上，PCF1 的抗性诱导效果明显、而且是系统性的，主要表现为限制病斑的扩展。当改用全株喷雾时，限制病斑扩展的作用明显提高，同时使病菌侵染率也相应降低，这对田间使用是很有利的。

表 1 孢子制剂 PCF1 在烟苗上对赤星病的控制效果

Table 1 Inductory effects of preparation PCF1 to elicit tobacco resistance

处 理*		位点发病率(%)	病斑面积(mm^2)	位点病率降低(%)	病斑面积降低(%)
悬滴诱导					
	PCF1	84.21	42.00	13.83	56.70
	对照	98.04	97.00		
全株喷雾					
	PCF1	24.73	9.90	59.43	88.96
	对照	60.95	89.7		

* 在两种处理方法中，都用菌株 TBA28 接种倒数 3－5 真叶，每叶 6－8 滴；"位点发病率"指发病的接种点占接种总位点数的比率。

2. PCF1 在田间的三种作用

(1) 控制发病程度：表 2 说明了 3 种趋势。①在多数情况下，PCF1 的作用主要是减轻发病程度，而菌核净还可明显减少病菌的侵染率。②PCF1 的防病效果明显，而且在烟草整个生长期都有作用，在烟草生长后期防效可达 76%。从病情指数降低的幅度看，它在多数调查批次(7/13)中效果与菌核净相当或稍高，但菌核净可以达到 95%以上的 防效(莒县试验点)，PCF1 则不及。③无论是 PCF1 还是菌核净，防病效果在试验点间差别明显，凡是 PCF1 效果不高的，菌核净效果也不明显或更低。

(2) 促进烟草生长、提高烟叶产量：对大田种植的 3 个品种，PCF1 可程度不同地增强烟株生长(平顶前后)和叶片扩展能力，并明显提高产量(表 3)。

(3) 改善烟叶品质、提高产值：从表 4 看出，PCF1 对改善烟叶的品质作用好于菌核净：尼古丁含量降低到适宜范围(2.5－3.0%)内；总氮和蛋白质含量亦有降低(改善卷烟吃味)；氯含量下降、钾含量增高，钾/氯比值有较大提高(增强卷烟的燃烧性)；糖含量的下降还表明 PCF1 的施入有利于烟叶烘烤过程中的物质转化[2]。根据这些指标衡量，菌核净并不是一种好农药。

表 2　孢子制剂 PCF1 和农药菌核净在田间对赤星病的控制效果

Table 2　Function of PCF1 to control brown spot in the fields

试验点（第一次施药时间，月·日）	调查批次	PCF1			菌核净			空白对照		
		调查株数	病株率（%）（减少，%）	病情指数（降低，%）	调查株数	病株率（%）（减少，%）	病情指数（降低，%）	调查株数	病株率（%）	病情指数
临朐	1	50	36.0	10.0	50	50.0	14.0	49	69.4	18.9
(8.1)			(48.1)	(47.0)		(27.9)	(25.9)			
	2	133	100	29.2	174	89.0	18.5	142	100	38.9
			(0)	(24.9)		(11.0)	(52.4)			
	3	145	100	43.9	144	99.8	33.9	150	100	57.6
			(0)	(23.8)		(0.2)	(41.2)			
昌乐	1	384	59.4	15.2	363	65.0	12.8	206	65.0	16.4
(8.9)			(8.7)	(7.3)		(0)	(22.0)			
	2	366	99.7	21.5	338	95.6	21.3	171	98.2	23.2
			(−1.5)	(7.3)		(2.6)	(8.2)			
	3	377	100	7.0	344	100	33.0	466	100	32.5
			(0)	(75.7)		(0)	(0)			
沂水	2	121	83.5	16.6	105	95.2	20.6	97	91.8	20.3
(8.6)	*		(9.0)	(18.8)	105	(−3.8)	(−1.8)			
沂南	1	300	81.0	85.0	300	88.0	22.0	300	81.0	20.3
(8.5)	**		(0)	(5.0)		(−6.7)	(−8.4)			
	2	535	80.0	20.0	571	84.0	21.0	355	90.0	29.8
			(11.1)	(32.8)		(6.7)	(29.4)			
	3	300	67.0	21.7	300	56.0	17.5	300	98.0	49.0
			(31.6)	(55.7)		(42.9)	(64.3)			
莒南	1	120	72.5	23.7	120	55.0	15.6	120	97.5	34.4
(8.1)			(25.6)	(30.9)		(43.6)	(54.5)			
	2	100	95.0	25.5	100	75.0	12.6	100	94.0	27.6
			(1.1)	(7.7)		(20.0)	(54.3)			
	3	100	100	17.6	100	15.0	1.9	100	100	40.9
			(0)	(57.0)		(85.0)	(95.4)			

* 沂水点第一,三次喷药后连续降雨,10天后查 PCF1 和菌核净均无效果。

** 沂南点第一次喷药前后(8月4日至8日)连续降雨。

表 3 试验点上 3 个烟草品种的生产性状

Table 3 Function of PCF1 to improve agronomic properties of tobacco

品种（试验点）	处理	株高		最大叶面积		产量	
		测定值(cm)	增加(%)	测定值(cm)	增加(%)	实值(kg/亩)	增加(%)
NC89	PCF1	57.2	0.1	855.2	5.8	220.4	37.6
（临朐、	菌核净	50.6	−13.8	891.5	10.7	148.9	8.2
昌乐）	对照	57.7		805.4		137.6	
NC82	PCF1	84.5	16.6	1383.3	5.2	未	
（莒县）	菌核净	74.0	2.1	1342.1	2.1	记	
	对照	72.5		1341.92			
K326	PCF1	110.4	4.5	2211.1	7.7	181.6	6.5
（沂南）	菌核净	103.8	1.7	2458.2	19.7	198.3	16.2
	对照	105.6		2053.21		170.7	

表 4 烟叶化学成分测定结果

Table 4 Function of PCF1 to improve chemical quality of the cured leaves

处理	还原糖(%)	总糖(%)	尼古丁(%)	总氮(%)	蛋白质(%)	施木克值	钾(K_2O,%)	氯(Cl^-,%)	钾/氯
PCF1	11.58	14.07	2.78	2.08	10.01	1.41	0.81	0.76	1.10
菌核净	11.4	12.66	3.89	2.28	10.08	1.26	0.67	0.83	0.80
对照	14.17	19.00	3.08	2.15	10.08	1.89	0.51	0.85	0.60

作为对外观质量的影响，PCF1 和菌核净都可增加上中等烟叶的比例，并明显提高烟叶单价和产值(表 5)。

表 5 试验点烟叶销售质量性状

Table 5 The output values increased by PCF1 application

品种（试验点）	处理	上中等比例(%)（上等烟比例，%）	价格		产值	
			实际价(元/kg)	增加(%)	亩产值(元/亩)	增加(%)
NC89	PCF1	85.90(34.50)	4.22	13.44	598.60	16.89
（临朐、	菌核净	82.90(34.70)	4.20	12.91	626.45	22.23
昌乐）	对照	82.30(29.20)	3.72		512.26	
K326	PCF1	93.82	4.19	9.69	761.57	16.82
（沂南）	菌核净	96.33	4.44	16.23	880.45	35.01
	对照	88.49	3.82		651.92	

三、讨　论

诱导抗性的利用作为病害无公害治理的一种策略，对控制烟草赤星病有特殊意义。首

先，中国是世界上烟草赤星病发生最重的产烟国家，赤星病也是国内烟草上最重的叶斑型病害[7]，除直接影响烟叶产量和内在品质外，工业工艺中不作打叶复烤使烟叶外观质量也受影响，这都是影响我国烟叶质量提高和外销的原因[2]。第二，对烟草病害的控制要求同时兼顾对烟叶生产和品质性状的改善；化学农药的残留已被作为衡量烟叶质量的标准之一。最后，诱导抗性不仅可以实现对病害的无公害治理，还因为诱导因子的广泛性和抗性诱导机制的不同而可以采用多条利用途径（董汉松，1992）。本文所述是作者研究中的利用途径之一[7]，表明病菌弱毒株孢子制剂的直接应用可以收到控制病害、提高烟叶产量和改善烟叶质量的效果。

对有关技术问题的考虑是：已知病菌与寄主的接触频率是病菌强致病力菌株的发生和赤星病流行的主要原因[8]，孢子灭活可以排除这方面的潜在危险；菌核净是目前被广泛使用的防治赤星病的有效农药，用它作参比是想最终以诱导抗性的利用取代化学防治，实现这一目的的关键在于提高 PCF1（和其它诱导抗性利用途径）的防病效果。作者试图从机制上做到这一点：试验表明病菌弱毒株的抗性诱导作用与孢子壁成分有关，一种尚待鉴定的孢子壁组分可以作为刺激烟草产生抗性的因子起作用；孢子壁的破碎细度与抗性诱导效应呈正相关关系[7]，本研究中 PCF1 全株喷雾可以增强防病效果的现象也说明了这一点。最后须指出的是，PCF1 增强烟草生长和改善烟叶品质的作用不单是通过控制赤星病实现的，在不发病的烟株上也有这种作用。

参 考 文 献

[1] 张元恩，植物诱导抗病性研究进展。生物防治通报，1987，**3**(2)：89－90。

[2] 张永耀等，津巴布韦烤烟生产技术，1992，13－33；191－199。上海科学技术出版社。

[3] 董汉松，植物诱导抗性的机制和应用前景，植物抗性生理研究，1992，193－210。山东科学技术出版社。

[4] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力分化和弱毒株抗性诱导作用的研究，植物保护学报，1992，**19**(1)：87－90。

[5] 董汉松等，赤星菌弱毒株 TBA16 对烟草抗赤星病诱导作用条件的研究，植物保护学报，1993，**20**：129－134。

[6] 董汉松等，烟草赤星病损失估计模型的建立方法，中国烟草学报，1993，**1**(4)：66－69。

[7] 董汉松等，根据植物－病原物互作控制烟草赤星病的途径，山东科学，1993，**6**(2 植物病理专辑)：1－9。

[8] 董汉松等，中国烟草赤星病菌致病力在地理上和品种中分化状况的研究，山东科学，1993，**6**(2 植物病理专辑)：25－33。

CONTROL OF BROWN SROT BY INDUCED RESISTANCE IN TOBACCO: 1. FIELD APPLICATION OF 'PCF1', A PREPARATION FROM CONIDIA OF *ALTERNARIA ALTERNATA* STRAIN TBA16

Dong Hansong, Sun Xiaoping, Bu Xiaodong,
Zhang Liuyi, Zhang Shouhou, Zhao Bing,
Li Zhenxi, Li Qidong, Lin Yongzhu, Liu Chengxin,
Yang Jutian, Niu Zhufeng, Yin Dongsheng,
Cui Zhiyun, Zhang Mingsheng and Zong Shulin

The hypovirulent strain(st.) TBA16 of *Altrenaria alternata* had been evidenced to be able to induce systemic resistance of tobacco to brown spot, by selecting 268 strains of the pathogen from flue-cured tobacco of 12 provinces in China and from oriental tobacco of Thenssaroniki in Greece. A preparation, PCF1, was made from the st. TBA16 conidia which showed best effect of resistance induction when different components in structure and molecule of the strain were tested for their role of inducing resistance. In pot-planted tobacco seedlings, PCF1 gave effects of inducing systemic resistance of the plant to the disease at 57% when it was inoculated on two leaves of the seedlings by droplet method and at 89% when sprayed to the plants, where a st. TBA28 with strong virulence was used as challenger. The field application of PCF1 was carried out in 5 counties of Shandong Province, and proven that the preparation functioned in controlling brown spot, enhancing growth and increasing output of tobacco, and improving quality of cured leaves. The function of disease control of PCF1 was mainly by its restricting the spot extension, with an effect range of 25—50% at early stage and the best effect of 76% at late stage of the plant growth, in different plots of cvs NC89, NC82 and K326, which were planted in the testes. In the fields, PCF1 enhanced growth ability at 5—17% and increased leaf development at 5—7%, and raised output of cured leaves at 7—38%. The improvement of chemical quality of cured leaves was achieved by PCF1 application and crucially indicated as (*a*) nicotine reduction from 3.08%(CK) to 2.78%, and (*b*) K^+ increase and Cl^- decrease, and resulted in raise of K/Cl ratio from 0.6 to 1.1, when 9 parameters in chemical quality were tested.

抗病性诱导剂 SRS 对烟草赤星病的控制作用及其他有益影响

董汉松 刘爱新 王彦亭 刘伯新 范洪慈 刘广玉 王仍成
陈建文 孙衍坤 张留义 钱玉梅 高正良 许权阁 孙学勤 桑传杰

对烟草抗赤星病诱导的研究是作者 1990 年首先报道的[5]，现已在诱导抗性机制和利用途径上获得多方面结果：①病菌 AT 毒素作为识别因子与烟草细胞膜上受体分子间的特异结合[2]，使得毒素胁迫抗病性的途径非常有效，目前已借体细胞无性系变异（SV）程序获得烤烟品种 NC89 抗病的再生植株后代和种子（定名为 NC89－TT）；②由番茄条斑病毒（ToMV）弱毒株 N14 和黄瓜花叶病毒（CMV）的卫星病毒 SV52 诱导的抗病性已通过组织培养传递给再生株的一代种子和二代植株，所得抗病无性系分别定名为 NC89-V1 和 NC89-V2；③根据病菌弱毒株孢子的抗性诱导作用[3]依赖于孢子壁上有激发子（elicitor）[2]功能的物质的作用这一机制[4]，已经研制成抗病性诱导剂 SRS，它在田间显示控制赤星病、改善烟叶品质等有益影响。对①、②已有另文报道[5]，本文是③的主要研究结果（1990－1993 年进行研究）。

一、材料和方法

1. 材 料

（1）赤星菌菌株：弱毒株 TBA16 用于制备赤星疫苗 PCF 和抗病性诱导剂 SRS；强毒株 TBA28 用于室内测定的挑战接种。

（2）烟草品种：室内测定用烤烟品种 NC89；田间试验中用当地推广品种，山东 3 个试验点都是 NC82，安徽两点都是 NC89。

（3）化学农药：菌核净 25％可湿粉，浙江温州市鹿城植保化学厂产，每亩 140g 兑水喷雾；速克灵 50％可湿粉，日本住友化学工业株式会社生产，每亩 60g 兑水喷雾。

（4）SRS：分两种：①SRS1 含菌株 TBA16 孢子壁分离物（PCF）0.5％（W/V）、化学诱导因子 ID1[6]0.6％（W/V）、利福平 150μg/ml（防细菌污染）、展着剂（少量）；②SRS2 除以上成分外，还含增效剂 8％（W/V）。均 500ml 避光封装，兑水 300－500 倍喷雾。

2. 室内测定

（1）SRS 的抗性诱导效应：品种 NC89 在温室内长到 7－9 叶期，用 SRS1 和 SRS2 按上述浓度喷洒烟苗 5 叶以下真叶，第 12 天用赤星菌菌株 TBA28 孢子（10^5±1ml）悬液悬滴挑战接种第 6、7 真叶，方法同文献[3]。各处理 6 棵苗，以不诱导的另 6 棵苗同样挑战接种为对照，抗性诱导效应表示为赤星病斑面积减小的百分数。

（2）防病效果对比：用菌核净、速克灵、SRS1、SRS2 按上述用量喷洒 NC89 幼苗（11

—13 叶期)全株,各处理 8 棵苗,以喷水为对照。按以前的方法[7]在第 12 天种 TBA28、检查病情、计测防治效果。

3. 田间试验

(1) 试验点:山东 3 县 3 点:昌乐南郝乡,13.4 亩; 沂水沂水镇,6.0 亩;沂南葛沟乡,2.5 亩。安徽 2 点:亳州淝合镇,3.0 亩;凤阳(安徽省烟草公司烟草研究所试验田),2.5 亩。

(2) 处理和设计:试验制剂 SRS1、SRS2,对比农药菌核净、速克灵,随机区组 3 重复。田间始见赤星病病斑时开始第一次喷药,以后间隔 10—15 天再喷两次。

(3) 防治效果计测:每次喷药后定期调查病性,计测病情指数[8]和防治效果。

(4) 产量性状测定:包括 3 项内容:①第一次喷药后约 10 天(或平顶前)测量植株高度;②第二、三次喷药后、中上部叶采收前测定腰叶、上二棚或顶叶部位最大叶的叶面积,这两项测定不少于 50 株;③烟叶产量的测定是在每次采收时分处理标记、常规烘烤,最后得到产量的实际值。

(5) 烟叶质量等级和产值:是每次标记出售的实际记录值,由此得到上等烟叶比例、价格、产值的实际平均值。

(6) 烟叶内在品质:取上桔二叶,每处理 1kg 样品,委托中国烟草总公司青州烟草研究所中心分析室作常规分析。

二、结果和结论

1. SRS 的抗性诱导效应和室内防病效果

从表 1 知,SRS1 和 SRS2 都可明显诱导烟草对赤星病的系统抗性,当喷雾到烟草全株上时,防病效果都接近 100%,与菌核净、速克灵相当。

表 1 SRS1 和 SRS2 对烟草抗赤星病的作用情况

Table 1 The resistance inductory effects of SRS1 and SRS2

制 剂	杀菌剂	抗性诱导效应测定		防效对比测定	
		病斑面积(mm^2)	抗性诱导效应(%)	病斑面积(mm^2)	防治效果(%)
SRS1		33.00	60.19	0.01	99.98
SRS2		40.55	51.09	0.01	99.98
CK		82.90		58.33	
	菌核净			0	100
	速克灵			0	10

2. SRS 在田间的三种作用

(1) 控制赤星病:表 2 是 5 个试验点的结果统计,表明 SRS 可以明显控制赤星病,SRS2 远好于 SRS1。比较来看,SRS2 在多数调查中效果好于菌核净,防效大致高 15—30%,而且中后期防效好于前期;速克灵防效较差。另外,无论 SRS2 还是菌核净,不同地

点间防效有较大差别。

表 2 SRS 与两种杀菌剂田间防治赤星病的效果比较

Table 2 The functions of SRS1 and SRS2 to control brown spot in the fields

试验点	施药日期(月·日)	调查日期(月·日)	病情指数					病情指数降低(%)			
			CK	SRS1	SRS2	菌核净	速克灵	SRS1	SRS2	菌核净	速克灵
山东											
昌乐	7.20	7.30	33.2	29.4	21.5	26.0	29.6	12.9	35.2	21.7	10.8
	8.3	8.9	35.5	28.4	24.1	19.9	27.6	19.9	32.1	44.1	22.2
	8.12	8.20	46.1	36.6	33.6	22.5	39.0	20.6	27.1	30.3	15.4
沂水	8.1	8.6	6.5	4.0	2.3	2.6	4.4	38.9	64.8	59.9	31.5
	8.10	8.20	16.6	9.9	5.4	8.2	12.6	40.1	67.2	50.2	23.9
	8.20	8.30	26.2	15.6	5.7	12.0	20.0	40.2	78.4	54.4	23.6
沂南	7.17	7.24	35.0	25.5	23.2	25.2	26.7	27.1	33.7	28.0	23.7
	7.29	8.6	54.8	26.1	21.4	25.0	27.2	52.4	61.0	54.4	50.4
	8.13	8.20	71.5	24.1	17.5	23.1	26.4	32.6	75.5	67.7	63.8
安徽											
亳州	6.30	7.9	9.4		1.7	4.2			81.9	55.3	
	7.14	7.22	60.5		43.5	41.7			28.1	31.1	
	7.25	7.30	51.9		40.1	43.2			22.7	16.8	
凤阳	7.10	7.20	1.7		1.3	1.5			23.5	11.8	
	7.20	7.31	3.4		2.7	2.1			20.6	38.2	
	7.30	8.10	4.0		3.1	1.2			22.5	70.0	

(2) 对生长、产量、产值性状的影响：SRS2 有促进烟株生长和叶片扩展的作用；有增加单叶重(35－108%)、增产(47－110%)、提高上等烟比例(13－27%)、提高均价(13－43%)、增加产值(79－136%)等有益影响(表 3)，在这些作用上均优于菌核净(表 4)。

表 3 不同防治区烟叶产量、产值性状测定结果

Talbe 3 The output and output value of cured tobacco leaves in different treatments

地点	处理	株高(cm)	叶长(cm)	叶宽(cm)	单叶重(g)	产量(kg/ha)	均价(rmb·y/kg)	产值(rmb·y/ha)	上等烟(%)
昌乐	SRS1	113.4	61.1	28.1	9.0	2228	2.29	5094	22.1
	SRS2	108.1	59.0	26.4	10.4	2584	3.05	7870	44.5
	菌核净	105.1	58.9	27.2	10.3	2546	2.94	7481	29.1
	速克灵	117.5	62.7	30.2	5.3	1323	2.72	3598	25.3
	CK	107.2	63.1	26.9	5.0	1229	2.71	3332	31.4
沂水	SRS1	113.2	59.8	28.5	13.3	2108	3.68	7757	
	SRS2	114.8	61.9	35.7	18.0	2593	3.93	10190	
	菌核净	113.6	60.0	29.8	15.3	2351	3.69	8875	
	速克灵	112.4	58.7	29.4	12.8	1906	3.53	6728	
	CK	111.0	58.3	28.4	10.9	1663	3.42	5687	
沂南	SRS1	105.5	60.0	29.2	8.7	1969	3.68	7245	51.2
	SRS2	108.4	61.9	30.6	8.7	2024	3.95	7999	68.6
	菌核净	106.9	61.5	30.9	8.2	2021	3.84	7759	47.2
	速克灵	102.9	62.5	32.4	8.1	1879	3.52	6614	50.3
	CK	106.4	60.1	28.7	6.4	1373	2.77	3803	41.2
安徽[1)]	SRS2	103.3	60.4	26.4	7.0	1964	3.84	7540	40.6
	菌核净	105.5	61.1	27.2	6.9	1935	3.51	6793	38.5
	CK	102.4	59.3	25.6	6.8	1907	3.75	7153	30.0

1) 亳州、凤阳两试验点平均。

表 4　SRS 和杀菌剂改善烟叶产量产值性状的情况

Table 4　The increase percentage of the output and output value in SRS1 and SRS2 application fields

地点	处理	单叶重增(%)	产量增(%)	上等烟比例增(%)	均价增(%)	产值增(%)
昌乐	SRS1	80.0	81.3	−9.3	−15.5	52.9
	SRS2	108.0	110.3	13.1	12.6	136.2
	菌核净	106.0	107.2	−2.3	8.5	124.5
	速克灵	6.0	7.7	−6.1	0.4	8.0
沂水	SRS1	22.0	26.8		7.6	36.4
	SRS2	65.1	55.9		14.9	79.2
	菌核净	40.4	41.4		7.9	56.1
	速克灵	17.4	14.6		3.2	18.3
沂南	SRS1	35.9	43.4	10.0	32.9	90.5
	SRS2	35.9	47.4	27.4	42.6	110.3
	菌核净	28.1	47.2	6.0	38.6	104.0
	速克灵	26.5	36.9	9.1	27.1	73.9

(3) 对烟叶内在品质的影响：从表 5 看出，SRS2 改善烟叶内在品质的作用比较明显：尼古丁含量适中、钾/氯比较高、糖/碱比合理，效果优于菌核净；总的来看，菌核净和速克灵对烟叶内在品质都产生不良影响，SRS1 居中。另外，PCF 是 SRS 的一种主成分，在改善烟叶品质方面显示明显作用，尤其在尼古丁、钾/氯比、糖/碱比上。

表 5　烟叶化学成分

Table 5　Chemical components and contents of the cured leaves from different treatment fields

烟叶来源		还原糖	总糖	尼古丁	总氮	蛋白质	施木	钾	氯	钾/氯	糖/碱
地点	处理	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	克值	(K_2O,%)	(Cl,%)		
沂水	SRS1	18.62	21.59	3.86	3.01	14.65	1.47	0.90	0.59	1.5	5.6
	SRS2	19.79	22.89	3.33	2.42	11.54	1.98	1.07	0.37	2.9	6.8
	菌核净	16.37	19.00	3.73	2.65	12.51	1.52	1.34	0.47	2.7	5.1
	速克灵	15.96	18.62	4.16	2.92	13.78	1.35	0.93	0.71	1.3	4.3
	CK	18.26	21.34	3.69	2.80	13.53	1.58	1.03	0.43	2.4	5.7
亳州	SRS2	13.51	16.66	3.70	2.04	8.75	1.90	1.35	1.34	1.0	4.5
	菌核净	11.30	14.07	3.74	2.15	9.39	1.50	1.36	1.70	0.8	3.8
	CK	13.76	17.75	3.84	2.07	8.76	2.02	1.03	2.00	0.5	4.6
昌乐	PCF	11.58	14.07	2.78	2.08	10.01	1.41	0.81	0.76	1.1	5.1
(1992)	菌核净	11.40	12.66	3.89	2.28	10.08	1.26	0.67	0.83	0.8	3.3
	CK	14.17	19.00	3.08	2.15	10.08	1.89	0.51	0.85	0.6	6.2

3. 结论

既能控制病害又能兼顾对烟草其他性状的改善(至少不产生不利影响)是烟草病害各种治理措施碰到的最大困难,SRS 的研制正是为了克服这一难点,室内外测定表明结果是理想的。这是因为:①SRS 的主成分 PCF 是病菌弱毒株 TBA16 的孢子壁组分,TBA16 是从国内 11 省 29 个烟区 320 个分离物中选出来的,是一个十分难得的材料;②PCF 和 ID1(SRS 的另一种成分)本身就具有改善烟叶品质的功能;③对此经过了近 6 年的测定[9]。SRS2 在控制烟草赤星病上的应用已显示出必要性和广泛前景:应用操作简便易行;从诱导抗性的利用作为病害无公害治理的措施来看,SRS2 取代杀菌剂具有优势;SRS (PCF)作用的原理已引导出从机制层次上对诱导抗性利用途径和研究,,分子状态的 elicitor 在诱导抗病性和改善烟叶品质方面的作用会更直接、更有效[10],对此种种可参见作者以前的文章[2,4,5]。

参 考 文 献

[1] Dong H. S. ,Wang Z. F. , Pathogenicity differentiation of *Alternaria alternata* and tobacco resistance to brown spot induced by weak virulent strains. CORESTA Inf. Bull. CORESTA Symp..1990, Greece,85.

[2] 董汉松,寄主植物与病原微生物间的相互识别,贾士荣主编,《农业生物技术进展与展望》,合肥:中国科学技术大学出版社,1993,65-79。

[3] 董汉松、于建立,赤星菌弱毒株 TBA16 对烟草抗赤星病诱导作用条件的研究,植物保护学报,1993,**20**:129-134。

[4] 董汉松等,接触识别导误与烟草抗赤星病诱导间的关系,本书。

[5] 董汉松等,根据植物-病原物互作控制烟草赤星病的途径,山东科学,1993,**6**(2):1-9。

[6] 董汉松等,三类因子在烟草抗赤星病诱导中的作用,山东科学,1993,**6**(2):47-52。

[7] 董汉松、王智发,烟草赤星病菌致病力测定方法的研究,山东农业大学学报,1989,**20**(4):1-8。

[8] 董汉松等,烟草赤星病损失估计模型的建立方法,中国烟草学报,1993,**1**(4):66-69。

[9] 董汉松等,中国烟草赤星病菌致病力在地理上和品种中分化状况的研究,山东科学,1993,**6**(2):25-32。

[10] Cole G. T. ,Hoch,H. C. , The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. New York and London:Plenum Press, 1992,347-362.

CONTROL OF BROWN SPOT BY INDUCED RESISTANCE IN TOBACCO: 2. PREPARATION SRS2, ITS FUNCTIONS TO CONTROL THE DISEASE AND TO IMPROVE QUALITATIVE AND ECONOMIC PROPERTIES OF THE CURED LEAVES

Dong Hansong, Liu Aixin, Wang Yanting, Liu Boxin,
Fan Hongci, Liu Guangyu, Wang Rengcheng,
Chen Jianwen, Sun Yankun, Zhang Liuyi,
Qian Yumei, Gao Zhengliang, Xu Quange,
Sun Xueqin and Sang Chuanjie

The SRS2, a preparation of resistance induction in tobacco, was made from cell wall components of spores of *Alternaria alternata*, combining with chemical ID1 as a resistance inducer. In greenhouse experiments, SRS2 showed over 50% effect of inducing tobacco resistance to and near 100% effect of protecting the plant from brown spot. Plot tests were carried out in 5 fields of Shandong and Anhui provinces, where dimethachlon, a desirable and popularly used fungicide, was applied as control. SRS2 gave 3 functions in the fields. In most observation sets, it made the disease severity decrease at over 75%, which was 15—30% higher than dimethachlon did. Analysis of chemical compounds indicated the roles of SRS2 to improve quality of the cured leaves, which showed 1.0—2.9K/Cl and 4.5—6.8 sugar/nicotine ratioes. The function of SRS2 improving the quality was proved to be contributed by the cell wall components of the fungal spore. Effects of the preparation to improve agronomic and economic properties of tobacco were also testfied. In the SRS2 applied fields, output and output value of the cured leaves were increased at 7—110% and 79—136%, which were evidently better than that in the dimethachlon applied fields.

烟草诱导抗病性多抗作用的研究

刘爱新　董汉松　姚　革　张广民
刘延荣　刘伯新　李振喜

利用诱导抗病性防治烟草主要侵染性病害的试验研究，在试验步骤上先以烟草赤星病为目标病害筛选诱导因子、建立应用途径，然后以烟草野火病（细菌病害）、普通花叶病（TMV，病毒病害）和黑胫病、低头黑病（系统浸染的真菌病害）为指示，验证诱导抗性的多抗作用，这些病害无论在种类上还是在重要性上都有代表性[1]。这一研究有一定的冒险性，因为虽有报道表明一种因子诱导的抗病性对抵抗多种病害都有效，但并非所有植物病害都这样，而且对烟草病害很少有多抗性的报道[2]。本文测定了4类因子和一种抗性诱导剂（SRS2），它们诱导的烟草抗病性只对抵抗一种或两种指示病害无效，以下报道研究结果（1993年测定）。

一、材料和方法

1. 材　料

（1）烟草品种：用烤烟品种NC89。

（2）诱导因子：有5种：①赤星菌（*Alternaria alternata*）弱毒株TBA16的孢子悬浮液（10^5±孢子/ml）；②化学诱导因子ID1（0.01%，W/V），为非生长调节剂类；③非病原细菌*Pseudomonas fluorescens*菌株P1（10^7cfu/ml）；④番茄条斑病毒（ToMV）弱毒株系N14，液体毒样由中国科学院微生物所提供，使用前在烟草品种G140幼苗上繁殖，诱导接种时用的是等体积磷酸缓冲液（pH7.0，0.02mol/L）研磨的汁液；⑤烟草抗病性诱导剂SRS2，主成分0.05%（W/V）。

（3）挑战菌株：赤星菌用强毒株TBA28；野火菌（*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*）用菌株PST1-2a；TMV用保存的新鲜毒样；黑胫病菌（*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*）用的菌株是PP8401；低头黑病菌（*Collectotrichum* sp.）用菌株C-IV-I，都是山东农业大学烟草研究室分离、保存的。

2. 诱导方法

用于挑战接种黑胫病和低头黑病的烟苗大小为25－30cm高、13－15叶期，其余用7－9叶期幼苗。诱导方法是：诱导因子①、②、⑤用喷雾法，处理第5真叶以下叶片；③用灌根法；④用汁液摩擦法，具体步骤、用量见文献[3]。各诱导8－12棵苗，以不处理的另6棵苗为对照；16－25℃下第10天作挑战接种。

3. 挑战接种

（1）接种赤星病菌：用叶面悬滴法，接种第6、7真叶，具体操作、诱导方法见文献[4]，

第10天检查病情。

(2) 接种野火菌：针刺4—7真叶，接种液含菌量为10^8cfu/ml，25℃下第15天检查。

(3) 接种TMV：从毒源烟草上取病样作汁液，汁液摩擦心叶，16—25℃下第10天检查。

(4) 接种低头黑病菌：依文献[5]，破伤夹茎长度为1.0—1.5cm，16—25℃下第20天检查。

(5) 接种黑胫病菌：先依[6]的方法灌根接种，第10天再依[5]的方法破伤(2cm)夹茎接种，16—25℃下第60天检查。

4. 病情定量方法

(1) 赤星病和野火病：计测病斑面积。

(2) TMV花叶病：计测病情指数，病级标准依[1]。

(3) 低头黑病：计测病情指数，病级标准由低头黑症状和剖茎病变两者确定，分0—4级：1级，植株不萎蔫，茎内接种点周围坏死长度小于接种夹茎长度的一倍；2级，接种一侧1/2以下叶片萎蔫，茎坏死大于夹茎长度的一倍(含)；3级，接种一侧1/2—3/4叶片萎蔫；4级，3/4以上叶片萎蔫。

(4)黑胫病：剖茎检查，计测发病(碟片形成)的茎长度。

5. 田间试验

引用的田间试验数据按以前的方法获得，为平均值或范围值。

二、结　　果

1. 赤星菌弱毒株诱导的抗病性

除对抵抗TMV花叶病无效外，对另4种病害都有明显的控制效果，其中对赤星病的诱导抗性最强，在田间效果也较好(表1)。

2. 化学因子ID1诱导的抗病性

对病害抵抗作用的强弱依次是：赤星病、低头黑病、野火病、黑胫病(表2)。

3. 细菌P1诱导抗病性的情况

从表3知，细菌P1对两种系统侵染的真菌病害无效或明显地诱导感病性；对野火病和赤星病抗性诱导效果比较明显，尤其是对赤星病，在田间也显示防病作用。

4. 病毒因子诱导的抗病性

对抵抗5种病害都有效，以对野火病和低头黑病的抗性诱导效果最强(表4)。

表 1　赤星菌弱毒株 TBA16 诱导烟草抗 5 种病害的情况

Table 1　Responses to 5 diseases of tobacco induced by hypovirulent strain TBA16 of *Alternaria alternata*

病　害	测定规模	烟草处理	病　情[1]	病情降低(%)
赤星病	温室内	诱导	9.9	88.96
		CK	89.7	
	田间	诱导	5.0—44.0	43.9—85.0
		CK	16.3—57.6	
野火病	温室内	诱导	2.5	33.33
		CK	3.8	
TMV 花叶病	温室内	诱导	43.2	−35.00
		CK	32.0	
	田间	诱导	28.5	−3.26
		CK	27.6	
低头黑病	温室内	诱导	30.0	53.85
		CK	65.0	
黑胫病	温室内	诱导	4.8	40.62
		CK	8.0	

1）赤星、野火以病斑面积(mm^2)计，黑胫以病茎长度(cm)计，另两种病害以病情指数计。

表 2　化学因子 ID1 诱导烟草对 4 种病害抗性的情况

Table 2　Responses to 4 diseases of tobacco induced by ID_1

病　害	烟草处理	病　情	病情降低(%)
赤星病	诱导	6.5	73.34
	CK	24.4	
野火病	诱导	2.5	33.33
	CK	3.8	
低头黑病	诱导	32.2	50.46
	CK	65.0	
黑胫病	诱导	5.8	28.13
	CK	8.0	

表 3　非病原细菌诱导处理的烟草对 4 种病害的反应

Table 3　Responses to 4 diseases of tobacco induced by *Pseudomonas fluorescens* P1

病　害	测定规模	烟草处理	病　情	病情减弱(%)
赤星病	温室内	诱导	3.1	94.36
		CK	55.0	
	田间	诱导	9.5—30.0	17.3—95.4
		CK	6.6—57.6	
野火病	温室内	诱导	1.6	57.89
		CK	3.8	
低头黑病	温室内	诱导	56.7	12.77
		CK	65.0	
黑胫病	温室内	诱导	11.8	−46.88
		CK	8.0	

表 4 病毒 N14 对烟草抵抗 5 种病害的诱导作用

Table 4 Responses to 5 diseases of tobacco induced by hypovirulent strain N14 of ToMV

病 害	烟草处理	病 情	病情减轻(%)
赤星病	诱导	11.1	57.14
	CK	25.9	
野火病	诱导	0.6	86.67
	CK	4.5	
TMV 花叶病	诱导	32.0	59.38
	CK	13.0	
低头黑病	诱导	6.7	83.33
	CK	40.0	
黑胫病	诱导	4.5	43.75
	CK	8.0	

注:均温室内测定。

表 5 SRS2 对烟草 5 种病害发病的影响

Table 5 Responses to 5 diseases of tobacco induced by SRS2, a preparation with resistance induction

病 害	测定规模	烟草处理	病 情	病情减轻(%)
赤星病	温室内	诱导	33.0	60.20
		CK	40.6	
	田间	诱导	2.3—33.6	27.1—75.5
		CK	6.5—71.5	
野火病	温室内	诱导	3.8	—2.56
		CK	3.9	
TMV 花叶病	田间调查	诱导	25.0—31.7	—14.86—9.42
		CK	26.7—28.3	
低头黑病	温室内	诱导	58.9	9.39
		CK	65.0	
黑胫病	温室内	诱导	5.8	28.13
		CK	8.0	

5. SRS2 的作用情况

SRS2 主要是为抗赤星病而制备的烟草抗病性诱导剂,还可诱导对黑胫病的抗性,但对另 3 种病害无明显影响。

三、结　论

有三：①以赤星病为目标筛选的诱导因子可程度不等的诱导烟草对其他病害的抗性，但事先确定病害目标也是诱导因子不能对所有病害都有效的原因，同时，不同病害在田间发生时间上的差别（如花叶病在早期而赤星病在中后期）也要求针对某个病害专门筛选诱导因子；②化学因子 ID1 和番茄条斑病毒弱株系 N14 可以诱导烟草对所有指示病害的抗性，尤其对系统侵染的病害的作用还需从机制上加以了解；③多效性的诱导抗性都是系统性的，可在烟草上自上到下或自下到上传导。这 3 种现象包含多方面的机制并值得进一步研究，以找到更理想的应用途径，对此，作者[7,8]和其他人[9]都已谈到。对某些多效性、高效性诱导因子和它们诱导的抗病性，生产上可根据病害流行和防治适期的共同性加以协调利用，赤星病的田间防治试验是一个例子。

参 考 文 献

[1] 刘延荣等，山东农业大学学报，1993，**24**：137－142。

[2] Kuc，J.，CORESTA Inf. Bull. 8th Tob. Sci.，Guangzhou，1988，25－40.

[3] 董汉松等，山东科学，1993，**6**(2)：47－52。

[4] 董汉松等，植物保护学报，1992，**19**：87－92。

[5] 张广民等，植物病理学报，1994，**24**：367－371。

[6] 王智发等，植物病理学报，1985，**15**(1)：51－55。

[7] 董汉松等，山东科学，1993，**6**(2)：1－9。

[8] 董汉松，植物抗性生理研究（赵可夫主编），济南：山东科学技术出版社，1992，193－201。

[9] Cole，G. T.，Hoch，H. C.，The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals，New York and London：Plenum Press，1992，347－362.

TOBACCO RESISTANCE TO FUNGAL，BACTERIAL，AND VIRUS DISEASES INDUCED BY 5 FACTORS

Liu Aixin，Dong Hansong，Yao Ge，Zhang Guangmin，
Liu Yanrong，Liu Boxin and Li Zhenxi

Induced resistance of tobacco to brown spot，black lowering (*Collectrichum* sp.)，black shank，wild fire，and TMV mosaic was tested in greenhouse and partly in field plots，where present in the inducers were hypovirulent strain TBA16 of *Alternaria altermata*，nopathogenic *Pseudomonas fluorescens* P1，hypovirulent strain N14 of ToMV，chemical ID1，and SRS2，a preparation with resistance inductory function. A rate range of 41－89% of resistance induction in brown spot，black shank and black lowering was

given by the strain TBA16, from which the cell wall components of spores were taken as the function element of the SRS2. SRS2 showed 60% resistance inductory effect in the greenhouse and 75% protection for tobacco from brown spot in the field plots, while showed no role in inducing resistance of the plant to the other 4 diseases. Induced resistance to brown spot and wild fire was acquired at 28—87% by tobacco induction with the bacteria P1 which had no effect on the other 3 diseases. Resistance to all of the 5 diseases was induced by both N14 and ID1 at 28—87%. Practical approaches were suggested for utilizing the inducers to control tobacco infectious diseases.

诱导胁迫和无胁迫的烟草再生株及其后代对4种病害的反应

董汉松　刘爱新　张留义
张广民　刘延荣　张修国　孙运达

以改造烟草对赤星病的抗性为主要目标，利用植物体细胞无性系变异(SV)原理[1]，对现有品种进行改良的路线有二：诱导抗性通过组织培养向再生植株及后代传递；赤星菌(*Alternaria alternata*)AT毒素胁迫愈伤组织再生抗病植株。SV途径在理论上可以兼顾对其他性状的改良，包括：至少保持起始品种原有的、生产和品质方面的好性状；把SV中对其它病害抗性增强的变异株筛选出来，或者至少使抗目标病害的再生株对其他病害的抗性保持原有水平。在这一工作中，我们选择了现生产推广的优质、感赤星病的品种NC89，获得三类无性系：NC89-TT，NC89-V1，NC89-V2(由含卫星RNA的CMV株系SV52诱导后的NC89经组织培养再生)[2]。本文是对NC89-TT和NC89-V1多抗性测定的情况(1993年测定)。

一、材料和方法

1. 材　料

(1) 烟草品种：烤烟品种NC89。

(2) 病原物材料：用于抗病性测定的病原物有：①赤星菌强毒株TBA28；②野火菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)菌株PST1-2a；③低头黑病菌(*Collectotrichum* sp.)C-IV-1；④黑胫病菌(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)菌株PP8401；⑤烟草花叶病毒(TMV)，均为山东农业大学烟草研究室分离、保存。

(3) 诱导接种的病毒N14：是番茄条斑病毒(ToMV)的弱株系，液体毒样由中国科学院微生物研究所提供，在烟苗(G140)上繁殖，使用前取毒叶研磨得病毒汁液。

(4) AT毒素：用赤星菌TBA28按[4]的方法制备，毒素原液稀释后加到灭菌前的胁迫培养基中[3]。

2. NC89当代植株的抗性诱导

用N14摩擦接种5—6叶期幼苗的心叶，第10天用赤星菌挑战接种第4、5真叶，诱发病害后计测病斑面积，以不接种N14的挑战烟苗为对照，具体方法依[5]。

3. NC89-V1的产生方法

具体操作依[3]，大致过程是：从N14诱导后第10天的烟苗心叶取叶碟，经愈伤组织(CA)诱导(MS-11，28天)、继代(MS-2，21天)、芽诱导(MS-3，21—28天，芽段2—3cm)、

生根诱导(MS-41)后,原生苗长到3—5叶时移栽,再生株到6—7叶时接种赤星病,留抗病的植株结种子(NC89-V1),种子收获后保存在山东农业大学烟草研究室。

4. NC89-TT 的产生方法

具体操作依[2]。从不经诱导的5—6叶期NC89幼苗取叶碟,组织培养程序同1.3,但在MS-2继代后分别在MS-11中加65%和75%(V/W)AT毒素作两轮筛选,用抗毒素CA再生植株。一次再生株经赤星菌接种后,从抗病性增强50%以上的再生株上取叶碟重复培养,获得抗毒素的二次CA,由它再生的植株即为NC89—TT,所结种子现保存在山东农业大学烟草研究室。

5. 抗病性测定和病情定量方法

作抗病性测定的植株有:NC89(对照),NC89-V1一代、二代苗,NC89-TT一代、二代苗,依正常再生株的多少各接种6—30棵苗。

(1)接种赤星菌:用TBA28菌株,孢子悬滴法[6],计测病斑面积。

(2)接种野火菌:针刺法,计测病斑面积[7]。

(3)接种低头黑菌:夹茎法[8],计测病情指数[7]。

(4)接种黑胫病:灌根[9]、夹茎相结合,计测发病的茎的长度[7]。

二、结　　果

1. 诱导抗性经SV转移后的多抗作用

表1是NC89当代、NC89-V1第一、第二代抗病性不同的植株发生的频率。总的趋势是,当代苗诱导可使烟草对4种病害的抗性植株数有明显增多,经组织培养后,抗病性增强的植株占的比率依病害而异。赤星和低头黑情况相似,NC89-V1一代和二代植株以抗性提高20—50%的为主,高抗性变异的株数减少;野火和黑胫的情况正好相反,SV变异可产生较多的高抗性再生株及后代。

对NC89-V1第二代植株进行的抗病性测定表明,病毒因子N14诱导的抗病性通过组织培养到再生植株后,可经种子在无性系后代明显表现出来,仅对低头黑病的抗性略低(表2)。

2. AT毒素胁迫体细胞产生的抗病体

愈伤组织经AT毒素两轮胁迫产生了二次再生的抗病植株NC89-TT,一代、二代苗中抗病性增强的个体比例因病害有所不同(表3),趋势与表1的情况相似:对赤星、低头黑抗性增强的个体经SV再生程序后趋于减少,而对野火和黑胫的抗性变化情况正好相反。

NC89-TT第二代植株抗赤星病能力很强,但对另3种病害抗性表现较低并相近(表4)。

表 1 病毒 N14 诱导及再生植株抗病性变化的频率

Table 1 Frequencies of tobacco plants with increased resistance to 4 diseases after being induced by virus N14

病害（病情定量法）	与 NC89 比抗病性变化	抗病性变化的植株数/测定总株数		
		当代诱导苗	NC89-V1 一代	NC89-V1 二代
赤星病	相当（增或减 20%以下）	5/30	12/30	13/30
（病斑面积，mm²）	增 20—50%	6/30	12/30	14/30
	增 50%以上	19/30	6/30	3/30
野火病	相当	0/12	1/6	0/23
（病斑面积，mm²）	增 20—50%	3/12	2/6	5/23
	增 50%以上	9/12	3/6	18/23
低头黑病	相当	0/15	2/8	6/15
（病情指数）	增 20—50%	5/15	4/8	6/15
	增 50%以上	10/15	2/8	3/15
黑胫病	相当	2/8	1/6	0/8
（病茎长度，cm）	增 20—50%	2/8	1/6	2/8
	增 50%以上	4/8	4/6	6/8

表 2 NC89-V1 第二代的抗病表现

Table 2 Enhanced resistance to 4 diseases in the somaclone NC89-V1

病害	病情		NC89-V1 抗性增强（%）
	NC89	NC89-V1	
赤星病	60.7	6.1	80.72
野火病	4.5	1.0	77.78
低头黑病	40.0	24.0	40.00
黑胫病	8.0	2.5	68.75

表 3 AT 毒素胁迫 CA 再生的植株抗病性变化的频率

Table 3 Frequencies of tobacco plants with enhanced resistance to 4 diseases after AT-toxin stress in tissue cultures

病害	与 NC89 比抗病性变化	抗病性变化的植株数/测定总株数	
		NC89-TT 第一代苗	NC89-TT 第二代苗
赤星病	相当	0/20	0/19
	增 20—50%	18/20	11/19
	增 50%以上	2/20	8/19
野火病	相当	不测定	5/25
	增 20—50%		4/25
	增 50%以上		16/25
低头黑病	相当	不测定	6/15
	增 20—50%		5/15
	增 50%以上		4/15
黑胫病	相当	不测定	2/8
	增 20—50%		0/8
	增 50%以上		6/8

表 4　NC89-TT 第二代的抗病表现

Table 4　Enhanced resistance to 4 diseases in the second progeny of NC89-TT

病　害	病　情		NC89-TT 抗性增强(%)
	NC89	NC89-TT	
赤星病	9.0	0.7	92.22
野火病	2.5	4.5	44.44
低头黑病	22.7	40.0	43.25
黑胫病	8.0	4.5	43.75

三、结论和讨论

①无论是哪条路线，以抗赤星病为目标筛选的无性系后代中都包括对其他病害抗性增强的植株，说明 SV 途径可以实现对烟草多种病害的同时改造；②两条路线在增强烟草对不同病害抗性提高的变异的效果上有所不同，AT 毒素胁迫增强了抗赤星病选择的有效性(从 81%到 92%)，也同时限制了对其他病害抗性变异的选择。但改造的方法并不难：野火菌、黑胫菌、低头黑病菌都可以产生毒素，前人已有毒素胁迫成功地改良了烟草抗病性的例子[10]，这对多抗性同时改造是一个很好的启示。

还有两方面密切相关的问题：①烟草对赤星和低头黑病、对野火和黑胫病的诱导抗性经 SV 程序后，在发生频率上共同表现出递减、递增的现象，这只能从病原物致病机制和寄主抗病机制的共同性及基因控制的同源性(如在染色体上排成相近的核苷酸序列集团[11])来了解，关于诱导抗性 DNA(主要是控制 PR 蛋白的序列)启动子的分离和转化表达[12]，说明作这方面的工作很快会有突破；②3 个无性系向品种化方向的研究对生产实际是急需的，但在抗病稳定性、兼顾多抗性及其他好性状的保持等方面还要做许多工作，已于前述[1－3]。

参　考　文　献

[1] 董汉松等，烟草抗病基因源的利用与抗病育种策略，山东科学，1993，**6**(2)：53－60。

[2] 董汉松等，AT 毒素胁迫的再生烟草及其后代对赤星病的抗性，植物保护学报，1994，**21**：321－326。

[3] Dong，H. et al.，Inducers of tobacco resistance to brown spot (4). Plant Pathology and Biotecnology (Li，D.，ed.)，Shanghai：Shanghai Sci. Tech. Pub.，1994.

[4] 董汉松等，赤星菌毒素对烟草幼苗致病特性的研究，山东科学，**6**(2)：39－46。

[5] 董汉松、于建立，赤星菌弱毒株 TBA16 对烟草抗赤星病诱导作用条件的研究，植物保护学报，1993，**20**：129－134。

[6] 董汉松、王智发，烟草赤星病菌致病力测定方法的研究，山东农业大学学报，1989，**20**(4)：1－8。

[7] 董汉松等，烟草诱导抗病性多抗作用的研究，本书。

[8] 张广民等，烟草低头黑病病原菌的研究，植物病理学报，1994，**24**：367－371。

[9] 王智发等，山东烟草黑胫病菌生理小种分化的研究，植物病理学报，1985，**15**(1)：51－55。

[10] Wernsman E. A.，Germplasm sources and breeding strategies for developing tobaccos with disease and pest resistance，CORESTA Inf. Bull. CORESTA Symp.，1990，Hellas. 55－84.

[11] 董汉松，病原物吸附，中国农业百科全书・植物病理(方中达主编)，北京：农业出版社，1996。

[12] Cole G. T. ,Hoch H. C. ,The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals, New York and London: Plenum Press,1992,347—362.

RESISTANCE TO 4 DISEASES IN TOBACCO SOMACLONES NC89-TT REGENERATED FROM AT-TOXIN STRESS TISSUE CULTURE, AND NC89-V1 FROM NO STRESS TISSUE CULTURE OF VIRUS-INDUCED PLANTS

Dong Hansong, Liu Aixin, Zhang Liuyi,
Zhang Guangmin, Liu Yanrong, Zhang Xiuguo and Sun Yunda

Tobacco somaclone NC89-TT was obtained from the flue-cured cv NC89 *via* tissue culture pressured by AT-toxin of brown spot pathogen *Alternaria alternata*, and somaclone NC89-V1 was obtained *via* tissue culture from the plants previously induced by hypovirulent strain N14 of ToMV (tomato streak virus)which had been proved to be the best inducer for inducing tobacco resistance by selecting 5 viruses and their 16 combinations. The 2 clones were tested for resistance to brown spot(BS), wild fire(WF), black lowering (BL), and black shank (BSh). Frequencies of resistant regenerated tobacco showed the same model of gradual decrease from the lst to the 2nd progenies in BS and BL, and showed a inverse model of gradual increase in WF and BSh. Resistance degree of the 2nd progenies of the 2 somaclones were tested, as comparing with their parent NC89. The NC89-TT progeny increased resistance at 92.2% to BS, 44.4% to WF, 43.8% to BSh, and 43.3% to BL. The NC89-V1 progenies enhanced resistance at 80.7% to BS, 77.8% to WF, 68.8% to BSh, and 40.0% to BL. The reasons and application potential of the multipul induced resistance were suggested.

烟草花叶病、黑胫病、低头黑病产量产值损失估计研究

刘延荣　董汉松　宗树林　肖庆义　宗显华

花叶病和黑胫病在全国各烟区普遍发生，且较严重，低头黑病则是在山东烟区经常造成严重危害的地方病。对烟草病害的危害程度，以前一直用病情(严重度、病情指数、发病面积等)表述，偶见记载的产量或产值损失的数字大都是根据经验粗略估计的[1]。严格按统计学原则作损失估计的研究一向空白，这也是因为烟草分期采收、调制等作业特殊性增加了这一研究的难度。无论从科学地评价病害严重性这一学术意义，还是从准确了解病害损失而加强控制这一生产实用意义来看，根据统计学要求、烟草生产特点及病害发生规律进行损失估计研究，都显得十分必要。本文以 3 种病害为例对此作了研究(1989－1991年)。

一、研究方法

1. X、Y 参数的获得

1989－1991 年在昌乐、临朐、诸城、沂水、莒县、沂南 6 县设系统调查点，按唯一差异原则[2](品种、生长期、农作条件等均一致)判断病级 X 并获得损失率 Y 的调查值。每县设 2－3 个调查点，7－10 天查一次，5 点取样，最少 3 次重复。

(1) 病级标准：以整株为单位。花叶病：0 级，全株无病；1 级，心叶脉明或轻微花叶，或上部 1/3 叶片花叶但不变形；2 级，1/3－1/2 叶片花叶，或少数叶片变形，或主脉变黑，或植株矮化为正常株的 1/3 左右；3 级，1/2－2/3 叶片花叶、变形或主侧脉坏死，或整株矮化为正常株的 1/2 左右；4 级，全株叶片花叶、严重变形或坏死，病株矮化为正常株的 2/4－3/4。黑胫病：0 级，无病；1 级，茎部病斑小于茎围的 1/2，或(和)半数以下叶片或顶叶轻度凋萎，或下部少数叶片有病斑；2 级，茎部病斑长于茎围的 1/2，或(和)半数以上叶片或腰叶以上部分叶片凋萎；3 级，茎部病斑环绕茎围，或(和)2/3 以上叶片或下二棚以上叶片凋萎；4 级，病株枯死。低头黑病：0 级，全株无病；1 级，茎部病斑为株高的 1/2(不含)以下，病侧个别叶片凋萎；2 级，茎部病斑延伸至株高的 1/2(含)以上，病侧叶片凋萎但尚未干枯；3 级，病斑延伸到值株顶部、病侧叶片干枯；4 级，病株枯死或近枯死。

(2) 产量损失率(Y_1，%)：至少作 3 次估计，即分别于采收下二棚、腰叶、上二棚或顶叶时调查。采收前两天按病级挂牌标记，烘烤后按病级分别称重，经与 0 级烟叶比较得 Y_1 值。每次调查至少采 50－100 片叶，重复 3 次以上。

(3) 产值损失率(Y_2，%)：对烘烤后的各病级烟叶由评级员评定价格，然后计算各病级烟叶产值损失百分数。

2. 方程的建立与验证

根据 Y－X 坐标分布特征确定两者关系的性质(如回归或相关),据此建立方程。方程的验证包括统计学和生产适用性验证,如当方程式为 $Y=a+bX$ 时,前一种验证是检验系数 b 是否显著,后一种验证是先估计出方程的标准误 $\sigma_{Y\cdot X}$,然后测验实际调查的 Y 值(Y_t)对方程的离回归程度,只有当至少 67.28%的 Y_t 落入 $\hat{Y}\pm1\sigma_{Y\cdot X}$ 内,或至少 95.48%的 Y_t 落入 $\hat{Y}\pm2\sigma_{Y\cdot X}$ 内时($\hat{Y}$ 是由方程计算的理论值),方程在 Y_t 来源的范围内使用才符合统计学要求[2]。

3. 大田产量、产值损失估计方法

(1) 设点与一般要求:在临沂、潍坊两大烟区的 20 个主要产烟县设普查点,每县选 2－3 个乡(镇),每乡(镇)选 2－3 块调查田,于采收前、中、后期各查一次。5 点取样,每次至少查 50－100 株,至少 3 次重复,可以取平均值的参数统计时取平均值。

(2) 参数:普查参数有:种烟面积 *M*(亩)、发病面积 *DM*(%)均由点到面估计到全省;亩产量 *K*(kg/亩)、不发病烟叶均价 *P*(元/kg)最终取全省平均值;某病级株数 *Ni*、调查总株数 *Nm* 按统一制作的表格以划"正"的方式记载。

二、结果与分析

1. Y_1－X 方程

(1) 方程的建立:将来自 6 个县系统调查的 Y_1 值对病级 X 画成坐标图(图 1),因为数据有相同或接近的情况,每种病害在坐标上都少于 6 个显示点。图 1 表明 3 种病害的 Y_1－X 关系均为直线回归型,即符合 $Y_1=a+bX$。

表 1 是选取 3 组的调查值,用于建立 Y_1－X 方程。

由表 1 的数据建立了产量损失率(%)对病级的关系式(Y_1－X 方程),列于表 2。

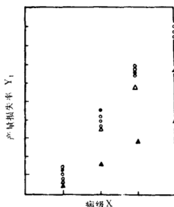


图 1 烟草花叶病、黑胫病、低头黑病产量损失率(Y_1)对病级(X)的坐标分布特征

Fig. 1 The relationship of yield loss with disease grades of tobacco mosaic, black shank, and black lowering.

(2)方程的适用性:在对以上 3 个 Y_1－X 方程作验证时,所用的产量损失率田间调查值(Y_{1t})来自对不同地块、品种、叶位在不同年份的调查,各 2—3 组 Y_{1t}－X 值,即 10－15 个观察值。Y_{1t}落入 $\hat{Y}_1\pm1\sigma_{Y_1\cdot x}$ 内的频率是:花叶病,80%;黑胫病,70%;低头黑病,100%,说明这些方程当用于不同田块、不同品种、不同叶位及不同年份时,估计精确性符合统计学要求。表 3 是验证方式的举例。

2. Y_2－X 方程

(1) 方程的建立:图 2 是 3 种病害 X、Y_2 调查值的坐标分布,表明 Y_2－X 为直线回归

关系。

表 4 是选出的调查值，用它们建立的 3 个 Y_2-X 方程列入表 2。

表 1　烟草花叶病、黑胫病、低头黑病产量损失率(Y_1,%)调查值

Table 1　The yield loss (Y_1,%) of leaves due to tobacco mosaic disease (TMD), black shank (TBS), and black lowering (TBL)

X	Y_1(%)		
	花叶病①	黑胫病②	低头黑病③
0	0	0	0
1	9.38	18.12	14.56
2	38.40	25.04	46.62
3	61.80	47.89	62.23
4	78.20	58.49	100

①品种 8608，上、中、下三叶位调查平均值。②品种中烟 14，上、中、下三叶位调查平均值。③品种 NC89，7 次采收调查的平均值。

表 2　烟草 3 种病害的 Y_1-X、Y_2-X 方程及显著性

Table 2　The equations and their significance of yield loss-disease grade (Y_1-X) and output value loss-disease grade (Y_2-X) of 3 diseases in tobacco

病　害	Y_1-X			Y_2-X		
	方程	Tb*	$\sigma_{Y_1 \cdot X}$	方程	Tb*	$\sigma_{Y_2 \cdot X}$
花叶病	$Y_1=-4.208+20.882X$	b^{3*}	5.279	$Y_2=-3.180+25.110X$	b^{3*}	9.029
黑胫病	$Y_1=0.560+14.674X$	b^{4*}	3.825	$Y_2=-0.600+17.750X$	b^{3*}	3.738
低头黑病	$Y_1=-4.852+24.767X$	b^{4*}	6.869	$Y_2=-3.186+24.190X$	b^{3*}	7.273

* 系数 b 显著性：b^*, $t>t_{0.05,3}$; b^{2*}, $t>t_{0.01,3}$; b^{3*}, $t>t_{0.05,3}$; b^{4*}, $t>t_{0.001,3}$。

表 3　对花叶病 Y_1-X 方程的验证

Table 3　The statistical test for the equation of yield loss-disease grade in tobacco mosaic

X	$\hat{Y}_1$	Y_{1t}		$\lvert \hat{Y}_1-Y_{1t} \rvert$	
		昌乐点，品种 8611	青州点，品种 G28	昌乐点	青州点
0	−4.208	0	0	−4.208	−4.208
1	16.674	16.960	33.000	0.286	16.230
2	37.556	34.340	36.500	3.216	0.956
3	58.438	66.000	63.100	7.562	4.662
4	79.320	76.200	76.300	3.120	3.020
$\lvert \hat{Y}_1-Y_{1t} \rvert<5.297$ 的观察值(%)					80.00

表 4　烟草花叶病、黑胫病、低头黑病产值损失率(Y_2)调查值*

Table 4　The output value loss (Y_2, %) of cured tobacco leaves caused by 3 diseases

X	Y_2		
	花叶病	黑胫病	低头黑病
0	0	0	0
1	11.00	16.70	18.00
2	54.00	34.10	48.07
3	78.30	58.60	59.90
4	91.90	61.80	100

* 调查值来源同表 1。

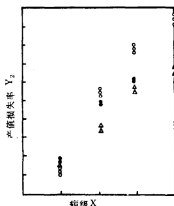


图 2　烟草花叶病、黑胫病、低头黑病产值损失率(Y_2)对病级(X)的坐标分布特征

Fig. 2　Output value loss in relation to disease grades of tobacco mosaic, black shank, and black lowering

(2) 方程的适用性：用与上述相似的方法验证表明，以上建立的 3 个 Y_2-X 方程在地块、品种、叶位或年份间均具统计学适用性，Y_{2t}落入 $\hat{Y}_2 \pm 1\sigma_{Y_2 \cdot X}$ 内的频率为：花叶病，90%；黑胫病，100%；低头黑病，100%。

3. 大田产量、产值损失估计

(1) 计算式：

产量损失 FY_1(kg)：

$FY_1 = M \cdot DM \cdot K \cdot TY_1$　　[FY_1 式]。

TY_1 是大田产量总体损失指数：

$TY_1 = \sum (Y_{1i} \cdot N_i) / Y_{1m} \cdot N_m$。

Y_{1i}由各病害相应的 Y_1-X 方程计算，i=0—4 级；Y_{1m}为令 X=4 时计算的 Y_1 值。

产值损失 FY_2(元)：

$FY_2 = M \cdot DM \cdot K \cdot P \cdot TY_2$　　[FY_2 式]。

TY_2 是大田产值总体损失指数：

$TY_2 = \sum (Y_{2i} \cdot N_i) / Y_{2m} \cdot N_m$。

Y_{2i}和 Y_{2m}计算方法与上相似。

(2) 大田生产损失估计：表 5 列出了 3 种病害 1989—1991 年的发病情况和根据以上公式计算的产量、产值损失估计值。3 种病害 3 年造成的产量总损失为 2489.61 万 kg，产值总损失 7399.19 万元，年均损失 800 多万 kg 和近 3 000 万元，其中以花叶病最甚。

表 5 烟草 3 种病害 1989—1991 年发生和生产损失情况

Table 5 The occurrence and caused losses in yield and output value of 3 diseases of tobacco in Shandong Province

病　害	年　份	发病面积(万亩)1)	产量损失(万公斤)	产值损失(万元)
花叶病	1989	43.00	747.83	1811.69
	1990	40.00	912.85	2944.87
	1991	38.70	655.33	2141.42
	Total	121.70	2316.01	6898.98
黑胫病	1989	0.20	1.71	3.87
	1990	5.00	58.51	130.34
	1991	6.95	58.00	176.60
	Total	12.15	118.22	310.81
低头黑病	1989	N2)	N	N
	1990	0.50	5.77	19.00
	1991	4.60	49.61	170.40
	Total	5.15	55.38	189.40

1) 三年种烟面积依次为 143.37、124.40、122.50 万亩；2) 漏记。

三、讨　　论

本研究首先着重于把统计学的有关原理、烟草生产特点和病害发生规律结合起来，形成一套适用于烟草侵染性病害损失估计的一般方法，这在国内还属于尝试。在大田生产条件下，对病害造成的实际损失是无法知道的，损失估计只是一种概率接近方法[1]。接近程度取决于研究方法，本文从方程的建立到大田损失估计，通过以下 3 点力图使估计具有高的接近程度：①在只有病级差别的条件下获得用于建立方程的参数调查值；②使用同一套病级标准并在不同调查批次间保证高的精确度(对病级作一致的判断)是方程具有一般适用性的基本条件；③对大田生产损失估计的准确性，除须保证上述精确性外，调查点选择和调查的代表性也是一个重要因素。

还通过选用参数来减少系统误差。X 用的是病级而不是病指数，这就免去了在获得用于建立方程和大田估计的调查值时的二级计算[2]，同时使用于大田损失估计的两个公式(“FY_1 式”和“FY_2 式”)彼此独立地反映病级与产量损失、病级与产值损失之间的关系：“FY_1 式”估计的是因病害而丧失掉的产量；“FY_2 式”估计的产值损失包括丧失的产量所具有的产值和残留产量中因受病害影响品质下降等所造成的产值损失两部分。公式中的“TY_1”和“TY_2”指数由田间直接调查值(一级数据)代入方程计算，再把它们代入“FY_1 式”或“FY_2 式”计算大田损失时，估计的准确性主要取决于在大田调查中按建立方程时所用的病级标准并作一致的判断，即调查的精确度。这就把受烟草生产的特殊性(如分期采收与烘烤)、病害发生规律和统计学原则制约的烟草病害损失估计，简化为主要受病理学因素影响。

参 考 文 献

[1] 南京农学院主编，田间试验和统计方法，北京：农业出版社，1978，194—201.

[2] Jones，D.G.，Plant Pathology，Principles and Practice. Open University Press，Milton Keynes，1987，73－88.

LOSS ESTIMATES OF TOBACCO LEAF YIELD AND OUTPUT VALUE DUE TO MOSAIC,BLACK SHANK, AND BLACK LOWERING DISEASES

Liu Yanrong，Dong Hansong，
Zong Shulin，Xiao Qingyi and Zong Xianhua

The occurrence and damage situation of tobacco mosaic，black shank，and black lowering diseases in 6 main tobacco producing counties of Shandong Province Were investigated from 1989 to 1991. Based on the results，two equations of the disease grade to yield loss(Y_1-X) and to output value loss (Y_2-X) for each disease were established. Two general formulas were presented for practical assessment of the disease-caused loss in fields. The estimates of field practical losses，calculated by FY_1 and FY_2 formulas，were 1403. 2，118. 2，and 55. 4×10^4kg in total yield (FY_1)；and 6899. 0，310. 8，and 189. 4×10^4 yuan in total output value(FY_2)，caused by tobacco mosaic，black shank，and black lowering diseases，resp.

烟草赤星病损失估计模型的建立方法

董汉松　刘延荣

植物病害损失估计主要是对病害所造成的产量和产值损失的估计，包括3个过程：① 建立损失程度与病害发生程度之间的关系模型或方程；② 用此方程对各级病情的损失程度进行估计，算出群体损失指数；③ 建立用于大田群体损失估计的公式，算出实际损失的估计值。鉴于国内对烟草侵染性病害损失估计尚缺乏研究，我们以赤星病为例说明包括在这3个过程中的方法(1989－1991年进行调查)。

一、模型建立的基本程序

1. 参数的获得

按统计学的唯一差异原则获得产量损失率(%)与病级(Y_1-X)和产值损失率(%)与病级(Y_2-X)两组观察值。病级(X)分为0—4级，Y_1和Y_2分别在采收烘烤和价格评定(或标记出售)后与0级烟叶比较来计算。

1989—1991年在山东临朐、沂水、昌乐、莒县、诸城、沂南6个主产烟县设调查点，每县3—5个地块，在相同的农作环境下从同一品种、同一叶位采至少100片成熟叶，定级后标记烘烤，每组(5对)观察值各3次重复。

2. 方程的建立和验证[1]

画图验证Y、X的坐标点分布特征，由此确定两者间的关系模型，并建立$\hat{Y}-X$方程。方程的验证包括统计学显著性检验和方程适用范围验证。在适用范围的验证中，需求出方程的标准误($\sigma_{Y.X}$)，检验另一组或几组实测的Y值(Yt)落入$Y\pm\sigma_{Y.X}$范围内的机率，统计学的要求是：有68.27%以上的Yt落入$\hat{Y}\pm\sigma_{Y.X}$范围内。Yt的观察值也在上述6县调查点按相同要求获得。

3. 大田群体损失估计[2]

在大田调查各病级的发生频率，由$\hat{Y}-X$方程计算出群体损失估计指数(TY)；建立大田产量、产值损失的计算公式，公式中包括几个必需的调查值。调查时每县选3—5个乡(镇)，每乡(镇)选3—5个点，调查点内按5点取样调查记载；由点上的调查值估算全省发病面积和病情(TY_1、TY_2)。

二、烟草赤星病$\hat{Y}_1-X$和$\hat{Y}_2-X$方程

1. 方程的建立

3年调查的产量损失率对病级(Y_1-X)和产值损失率对病级(Y_2-X)的坐标分布图

(略)，表明 Y－X 关系模型为 $Y=a+bX$。

表 1 选择了 1990 年一个调查点的数据，数值为 3 次重复的平均值，用它建立了以下两个方程。

表 1　赤星病 X、X_1、Y_2 的田间调查值(沂南县岸提乡唐子村；品种 G140，上二棚叶，1990)

Table 1　The tested values of disease class(X) and losses of output(Y_1) and output value(Y_2)

叶片病级(X)	产量(kg/100 叶)损失(%)(Y_1)	产值(元/kg)损失(%)(Y_2)
0	0	0
1	4.26	11.82
2	13.48	39.16
3	33.33	62.81
4	35.14	76.85

(1) 产量损失率对病级的回归方程：$\hat{Y}_1=-2.266+8.368X$　[$\hat{Y}_1-X$ 方程]

显著性：b^{3*}(符号意义为：b^*，$t>t_{0.05,3}$；b^{2*}，$t>t_{0.01,3}$；b^{3*}，$t>t_{0.005,3}$；b^{4*}，$t>t_{0.001,3}$)。

标准误：$\sigma_{Y.X}=2.341$。

(2) 产值损失率对病级的回归方程：$\hat{Y}_2=-2.072+20.469X$　[$\hat{Y}_2-X$ 方程]

显著性：b^{3*}　　标准误：$\sigma_{Y.X}=4.680$。

2. 方程的适用性验证

(1) $\hat{Y}_1-X$ 方程：据标准误 $\sigma_{Y_1}.x=2.341$，应有≥68.27%的实测 Y_1 值(Y_1)落入 $\hat{Y}_1=-2.266+8.368X\pm2.341$ 范围内。表 2 是验证情况，说明由品种 G140 上二棚叶的调查值建立的 $\hat{Y}_1-X$ 方程用于各部位烟叶的产量损失估计时，估计结果符合统计学的概率要求，同时也适用于不同年份和不同品种。

表 2　$\hat{Y}_1-X$ 方程的验证计算表

Table 2　Tests for Y_1-X equation

X	$\hat{Y}_1$	Yt_1 1)				$\lvert\hat{Y}_1-Yt_1\rvert$			
		1	2	3	4	1	2	3	4
0	−2.266	0	0	0	0	2.266	2.266	2.266	2.266
1	6.102	10.000	12.389	5.590	4.360	3.898	6.287	0.512	1.724
2	14.407	16.000	15.044	12.300	13.260	1.530	0.574	2.107	1.147
3	22.838	24.528	24.000	24.550	21.560	1.690	1.162	1.712	1.278
4	31.200	N 2)	N	39.840	33.460			8.640	2.260
$\lvert\hat{Y}_1-Yt_1\rvert\leqslant2.341$ 的观察值(%)					83.33				

1) Yt_1：1、2 分别为来自诸城县皇家乡 G140 的顶叶、腰叶，1990 年；3 来自沂南县岸堤乡，品种 K326，1991 年；4 来自沂南县烟田，品种 G140，1991 年。

2) N 为田间未发现此级病叶(下同)。

(2) $\hat{Y}_2-X$ 方程：因标准误 $\sigma_{Y_2}.x=4.680$，所以应有≥68.27%的实测 $\hat{Y}_2$ 值(Yt_2)值

落入 $\hat{Y}_2=-2.072+20.469X\pm4.680$ 范围内。表 3 的验证结果指出，$\hat{Y}_2-X$ 方程可以适用于不同部位的烟叶。

三、大田损失估计的方法

进行大田生产损失估计时，需获得以下观察值：① 种烟面积 M(亩)；② 无病烟叶产量(kg/亩)；③ 发病面积 DM(%)；④ 某病级发生次数 N_i(观察值数目)；⑤ 无病烟叶均价 P(元/kg)，然后按以下两套公式分别估算产量和产值损失。

表 3　$\hat{Y}_2-X$ 方程验证计算表

(Yt_2 来自诸城县皇家乡，G140，1990 年)

Table 3　Tests for $\hat{Y}_2-X$ equation

X	$\hat{Y}_2$	Yt_2		$\lvert\hat{Y}_2-Yt_2\rvert$	
		顶叶	腰叶	顶叶	腰叶
0	−2.072	0	0	2.072	2.072
1	18.397	9.976	14.394	8.421	4.003
2	38.866	43.187	31.006	4.321	7.860
3	59.335	60.706	62.810	1.371	3.475
4	79.804	N	82.840		3.036
$\lvert\hat{Y}_2-Yt_2\rvert\leqslant4.680$ 的观察值(%)				77.78	

1. 产量损失 FY_1(kg)

$$FY_1=M\cdot K\cdot DM\cdot TY_1 \qquad [FY_1\text{ 式}]$$

TY_1 为群体产量损失指数，计算式为：

$$TY_1=\frac{\sum(\hat{Y}_{1i}\cdot Ni)}{Y_{1m}\cdot N_m} \qquad [TY_1\text{ 式}]$$

各符号涵义是：$\hat{Y}_{1i}$由 $\hat{Y}_1-X$ 方程式计算，i=0—4 级；$\hat{Y}_{1m}$为 i=4 时按此方程计算为 $\hat{Y}_1$ 值；N_m 为 0—4 级调查值总数。

2. 产值损失 FY_2(元)

$$FY_2=M\cdot K\cdot DM\cdot P\cdot TY_2 \quad [FY_2\text{ 式}]$$

TY_2 为群体产值损失指数，计算式为：

$$TY_2=\frac{\sum(\hat{Y}_{2i}\cdot N_i)}{\hat{Y}_{2m}\cdot N_m} \qquad [TY_2\text{ 式}]$$

各符号意义与 TY_1 公式中的相似，$\hat{Y}_{2i}$和 $\hat{Y}_{2m}$由 $\hat{Y}_2-X$ 方程计算。

3. 1989—1991 年烟草赤星病损失估算

由上述 FY_1 计算的值是因病害发生造成的减产数量，由 FY_2 式计算的值包括这部分

减产完全丧失的产值和残存产量因病害造成的价格降低所减少的产值两部分。表 4 列出了对赤星病大田产量和产值损失的估算值，3 年产量总损失为 400 多万 kg，产值总损失 2900 多万元。

表 4 1989—1991 年赤星病大田发生和生产损失估计

Table 4 Estimates of tobacco output and output value loss caused by brown spot

年份	种烟面积 (万亩)	发病面积 (%)	产量 (kg/亩)	均价 (元/kg)	TY_1 ($\times10^{-2}$)	TY_2 ($\times10^{-2}$)	FY_1 (kg)	FY_2 (元)
1989	143.37	6.97	134.13	2.15	3.43	8.78	460065.90	2531972.01
1990	124.00	29.84	139.75	2.78	3.00	7.66	1551225.00	11011008.71
1991	122.50	34.38	130.60	3.84	3.84	9.82	2112334.08	15665377.58
总和							4123624.98	29208358.30

四、讨　　论

1. 关于病害损失估计的准确性

损失估计是对群体发病实际损失的概率趋近方法，估计的准确程度取决于 3 点：① Y—X 方程的准确性是群体损失估计准确性的关键。满足在 $\hat{Y}\pm1\sigma_{Y.X}$ 范围内能包括 68.27%个观察值、在 $\hat{Y}\pm2\sigma_{Y.X}$ 范围内包括 95.45%个观察值的条件，仅仅是方程能满足统计学要求而可以使用的最低条件。观察值落入该范围内的机率越高，估计准确性也就越高。这不仅要求所制订的病害分级标准应能反映发病程度的差别，而且还要求在获得用于建立方程的观察值的调查中，重复间应保证高的精确性。② 调查的整个过程中所提供的不同用途的观察值之间，应具有高的精确性。这要求在遵循唯一差异原则的前提下，不同调查人和不同批次的调查应使用同一套分析标准并对病级作一致的判断。③ 按 FY_1 和 FY_2 式计算大田生产损失时，估计的准确程度取决于公式中各个观察值的代表性，这依赖于选点和取样的代表性。

2. 烟草赤星病损失估计的意义

过去对烟草侵染性病害为害程度的定量描述都是用发病率和病情指数，表述生产损失时也只能举出零星的、未按损失估计方法估计的数字，本文的目的着重于提出一套具有一般适用性的对烟草侵染性病害进行损失估计的方法。从理论上讲，本文所建立的方程和公式具有由点到面的广泛适用性，也就是说，按唯一差异原则（其他条件相同，只有病级的差别），根据来自某品种某叶位的观察值所建立的方程，可用于其他条件下所有品种和不同叶位的损失估计。近年来烟草赤星病对烟草生产为害严重，本文对烟草赤星病的研究也是有利的。

验证表明按以上思路建立的 6 个方程都具有一般适用性，这在 Y_1、Y_2 参数选用上是作了考虑的。使用百分数而不是有质单位（如 kg/亩和元/kg），可以避免烟草作业条件、调制技术、烟叶收购中的质量等级（15 级或 40 级）等因素的限制。从建立方程到作大田损失

估计，所用的观察值都来自大田，这也使方程或公式适于在现行栽培实践中使用。另外，对3种病害生产损失的估计，使人们对病害为害的严重性有了一个明确的量的了解，从而能够加强病害控制。

参 考 文 献

［1］陈瑞泰等，烟草病虫害防治，济南：山东科学技术出版社，1988，1－9；47－49；76－95。

［2］南京农学院主编，田间试验和统计方法，北京：农业出版社，1978，194－201

［3］Jones，D.G.，Plant Pathology，Principles and Practice. Open University Press，Milton Keynes，1987，73－88

［4］方中达，植病研究法，北京：农业出版社，1979，1－13

MODELING METHOD FOR ESTIMATING TOBACCO PRODUCTION LOSSES CAUSED BY BROWN SPOT DISEASE

Dong Hansong and Liu Yanrong

Based on investigations during 1989－1991, two equations were established. ① Uotput loss percentage to disease class of brown spot: $Y_1 = -2.266 + 8.368X$. ② Percentage of output value loss to the disease class: $Y_2 = -2.072 + 20.469X$. The total loses of output and output value were estimated to be 4.12×10^6 kg and 2.92×10^7 yuan(Rmp) respectively in 1989－1991.

启 后 篇

关于植物-病原物互作和病害控制的思考

董汉松　徐文联

一、引　　言

自40年代提出基因对基因学说以来，人们对植物抗病与病原物致病的机制及其相互关系的研究遵循两条不同的理论路线。一是从染病体[1]到植物-病原物互作概念的发展，与后来的R-*avr*基因互作或产物识别的3个模式相互承接[2,3]，把植物-病原物互作看成一个体系，从互作的基因控制、遗传运作、生化过程、互作表型的时序性考察抗病和致病机制，并通过强化或削弱互作中的某种因子或环节来控制病害。二是从通常意义上的"病害三角"来考察抗病性与致病性，注重基因对基因互作在植物群体上的表现和环境条件的影响，并把它们作为抗病育种的重要因子[3]。前者以《植物-微生物分子互作》(Molecular Plant-Microbe Interaction)这本杂志在1988年创刊为标志，形成了一个互作学科分支，与分子生物学理论和技术在植物病理学科的发展相合拍[5~7]。后者理论体系的形成源于Vanderplank关于垂直与水平抗性的理论[8,9]，同"植病体系(pathosystem)"的理论[10]相一致，对抗病育种实践产生过并仍有很大影响。

从病害控制的生产实用来看，我们感到两个理论体系、尤其是前者涉及病害治理策略的多方面的问题。同时，总的来说两个理论体系、尤其是前者还只是一个框架，其中包括许多未被了解的细节、难点或悖论。这些问题有的已被前人注意、我们在以上篇目中也在篇目主题范围内作过讨论，本文将对它们给予总结、归纳；有的尚未被注意到，本文拟予以指出，无非是想理清对这些问题的困惑，使研究工作和病害控制更有成效。

二、关于互作的理论问题

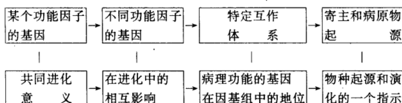
1. 互作研究的层面

可大致分3个范畴。①共同进化及基因库贮备：主要考察由植物-微生物共同进化导致现阶段稳定的植物-病原物互作体系形成的机制，包括抗病相关基因与植物、致病相关基因与病原物生命本源的关系、功能演化的过程、原因，由于工程植物和工程微生物的出现可能导致的再次共同进化等，已从各类*ds*和*avr*基因获得一个清楚的轮廓。②互作的基因控制和遗传运作：研究植物抗病相关与病原物致病相关的各三套基因的分离、鉴定和功能；R-*avr*基因互作的遗传运作方式，包括基因对基因关系在互作基因数目不同的体系中的运作形式(产物识别、非等位抑制、添加效应等)[3]、及在不同抗病类型(非寄主、非亲

和、诱导抗性)遗传控制(作为可遗传与不遗传的表型的控制基因的贮备)上的差别和表达时序及调控因子;R-*avr* 互作或产物识别对 *ds* 基因的启动机制及 *ds* 基因的表达时序和调控因子等。③互作的生化机制:主要包括两方面,一是由抗病防卫"链-环"反应首端信号(如激发子、非亲和互作等)引导的信号传导系统如何运转、如何与 TS 终端连接,二是抗病防卫功能因子的形成、积累的时序、参与抗病的"战斗"过程及不同因子的地位、作用和相互关系。

2. 尚待明确的问题

(1) 关于共同进化:从控制某种功能的基因的分子生物学特性(保守性、同源性、近簇分布、功能分区等)推知这族基因的进化来源、演化过程及与生命本源的关系,经对各种功能因子控制基因在这些方面的机制的研究,了解抗病或致病相关基因的进化来源、在染色体(或其他基因载体)上的定位与功能分区、及同一族基因和不同族基因演化及相互关系对植物-病原物互作现阶段特定体系与植物不同抗病类型和病原物不同致病手段(包括致病变种等种下病理单位)形成的作用,进而了解可能与物种演化有关的抗病和致病相关基因的共同进化意义。整个研究思路如下:



(2) 关于互作的基因控制和遗传运作:①必须在分离到 R 基因、证明其产物有识别 *avr* 基因靶点或其产物的功能之后,分子生物学概念中的基因对其因关系和从 R 到 *ds* 的表达的假设才能被认为是合理的。②从 R 到 *ds* 基因的表达,是否存在通过产物抑制或阻遏、基因的直接抑制或阻遏两个层次的机制?这种抑制或阻遏的解除是否可以通过对 R 和 *ds* 基因两个层次来实现?也就是植物的 *set*-3 基因是如何运作的。③在抗病性诱导过程中,是否不存在新基因产生的因素,还是这种因素尚未被发现?*ds* 基因中的易变序列具有寄主种的特异性,并可以通过微观变异发生[11],有些 *ds* 基因可以通过体细胞杂交和体细胞无性系变异途径从诱导型变为组成型表达,这对上述问题是一个很好的启示,可以对其机制作多种推论和研究。

(3) 关于抗病防卫的"链-环"反应:如以上篇目所述,对这种"链-环"反应仅仅是从首端和终端(基因 TS)有所了解,而对它的精确过程、其后的功能因子作用的层次性、时序性及在抗病防卫中的地位和作用,在大多数互作体系中并未获得全面了解。

三、关于病害控制问题

1. 病害治理策略

"有害生物综合治理(IPM)"强调防治的经济效益、措施的优化组合及生态协调,在一种病害上实行还容易做到,但对多种病害、甚至病、虫、草、鼠同时治理,最多只能把针对不

同有害生物的措施组合成在某种作物上使用的一个技术程序，而且这种技术程序在大多数作物上都未形成可被实施的规范。实际上，到目前为止实施的病害治理对策大致遵循了一个共同的原理：强化寄主植物，弱化甚至消灭病原物。例如：①化学防治主要是把病原物"置于死地"的做法，所以抗药性作为病原物的一种生存手段而产生，对化学防治效果的挑战已引起广泛注意；②生物防治或抗菌物质，如抗菌蛋白质、细菌素等的应用，是通过微生物区系抑制或病原物直接抑制或杀伤而弱化病原物种群或生命机能的一种措施，从长远看，实际上也是对植物-病原物共同进化施加了一种胁迫因子；③常规育种的种内杂交、细胞工程的远缘杂交是对某种作物引入按控制可遗传性状而运作的抗病基因（非 R 意义），同时给予病原物产生新的致病基因一个机会，所以单显性的抗病基因被引入一种作物后，易于为新的致病小种所克服，这是很常见的事实[12]。基因工程方法可以实现各种生物来源的抗病基因向作物的引入，也就是调动一切可能的手段强化植物、对付病原物，转基因植物一旦被广泛应用，也会有一个病原物产生对抗基因的问题；④人们已注意到所谓植物-病原物再次进化的风险[13,14]，这种风险既可以来自转基因植物，也可以来自基因工程微生物，更多地来自二者在新的条件下的互作。

所以我们感到植物病害的治理需要有一种策略上的转变：把强化植物、削弱病原物的措施转变为缓解二者"敌对"作用的手段，造成双方互惠的状态。这首先在理论上是可行的：①一个共知的事实是，病原物寄生能力越强、寄主专化性程度越高，它对寄主植物的致病作用越能在互作的较晚阶段发生、致病的程度也越低；在有亲和性分化的体系中，病原物显示出通过基因变异或非功能化而逃避被识别和杀死、延长活体生活期的能力；②豆科植物-根瘤菌共生互作是另一个事实，互作的发生发展依赖于植物与细菌决定不同阶段互作反应的基因[15,16]，类似情形还有菌根体系；③最后是全蚀病的自然消退，说明对植物从毁灭性的为害到较轻为害的"和平共处"状态的转变，可以在较短时期内自然完成。其次在操作上，也不是不可能的：或者强化植物与病原物"共生"关系的因子，或者按共生互作的模式改造植物-病原物互作性质，例如给植物引入一类能为病原物提供营养或生存条件的基因，同时给病物物引入一类对植物有利的基因。

但如果作为一种病害治理策略来研究，这种所谓"和平共处"关系的建造也是一项系统工作：①首先要选择一个容易改造的体系；②了解这个体系的遗传背景和参与互作的基因控制；③找出关键环节或基因作为改造的目标；④充分估计通过基因工程手段实现这种改造可能带来的风险。同时，对现阶段典型的互作体系，如果能获得共同进化的历史事件方面的资料，将会极大地有助于以上目的，但这对大多数体系几乎是不可能的，所以模拟和加速进化过程成为必要。

2. 抗源选择的理论依据

至少在分子植物病理学形成前，本文开头所说两条理论路线之间有很多争议。病原物致病性变异的发现和生理小种概念的提出，使抗病育种针对流行的小种选择显性单基因成为一个原则。基因对基因假说的诞生除了被日益证明的重大理论意义外，对抗病育种中的单基因选择提供了强有力的支持，尤其是在按孟德尔单基因位点遗传的病害中，遗传学家、植病学家和育种学家都相信一对基因的互作是决定植物抗病性的全部遗传因子，不少单显性抗病基因被引入作物对锈病的抗病育种，随之而来的是新的小种产生和引入的抗

病基因被迅速克服[12]。同时，对不同病害按单基因选育的高抗水平的品种对一个新小种比以前的品种更感病，这导致一种意见，认为这类抗病性不符合基因对基因假说，代表性理论是 Vanderplank 的"垂直抗性"和"水平抗性"的划分，认为前者按基因对基因关系运作，由主效基因控制，后者由多基因控制，不符合基因对基因学说；主效基因的抗病性是不能持久的，而后者不仅能持久抗病，而且可以抵抗一种病原物的所有成员（小种）[8]。这一理论的影响非常大，当时许多育种学家抛弃了单基因抗源转而选择微效多基因[12]；而且影响旷日持久，直到 80 年代，不少育种学家仍把汰除主效或"垂直抗性"基因作为育种程序的一个关键步骤（见：《植物病害防治和抗病育种》，联合国粮农组织、中华人民共和国农业部，1987，119 页）。无论对哪种理论依据，都需要从它的成效，即所育品种的实际表现来评价。

针对并非所有抗源都能从现有植物材料中找到（就控制可遗传性状的抗病基因来说）这一事实，体细胞无性系和配子体无体系变异被作为产生新抗源的途径；基因工程技术使得任何来源的基因引入成为可能；植物-病原物多基因互作被解释为按非等位抑制和微效基因对主效的基因对基因互作发生添加影响的机制表达[3]，表明"水平抗性"是按基因对基因关系的不同方式来运作。凡此种种，似乎都可以使得两种理论体系（见上文）由冲突而趋同，但它们作为抗源选择的依据对育种成效的影响，也许要到育种完全靠基因工程方法、杂交育种不再被使用的时候才失去意义。

3. 关于诱导抗性的利用（兼结语）

寻找可以对特定刺激作出反应的 TS，对它施加人工激发而开启抗病性；对植物的 *set*-3 基因通过去除阻遏或抑制基因及基因转化，使它变成组成型表达；期望 TS 在不同植物中对不同病害是共同的，它的开启将使植物对多种病原物侵染产生抵抗作用，这些都是利用诱导抗性控制植物病害最有诱惑力的视点。

参 考 文 献

[1] Loegering, W. Q., The relationship between host and pathogen in stem rust of wheat, Hereditas, 1966, **2**(Suppl.): 167－177.

[2] Gabriel, D. W., Rolf, B. G., Working models of specific recognition in plant-microbe interactions, Annu. Rev. Phytopathol., 1990, **28**: 365－391.

[3] De Wit, P. J. G. M., Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens, Annu. Rev. Phytopathol., 1992, **20**: 391－418.

[4] Leonard, K. J., Czochor, R. J., Theory of genetic interactions among populations of plants and their pathogens, Annu. Rev. Phytopathol., 1980, **18**: 237－258.

[5] Nakas, J. P., Hagedorn, C., Biotechnology of Plant-Microbe Interactions, New York: McGraw-Hill Pub. Comp., 1990.

[6] Sidhu, G. S., Genetics of Plant Pathogenic Fungi. Advances in Plant Pathology (Ingram, D. D., Williams, P. H. eds.), London: Acad. Press, 1988.

[7] Li, D., Plant Pathology and Biotechnology. Shanghai: Shanghai Sci. Tech. Pub., 1994.

[8] Vanderplank, J. E., Plant Diseases: Epedemics and Control, New York: Acad. Press, 1963.

[9] Vanderplank, J. E., Principles of Plant Infection, New York: Acad. Press, 1975.

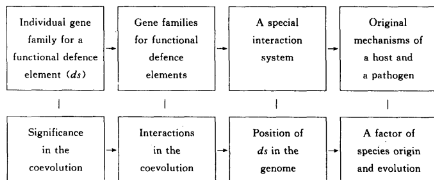
[10] Robison, R. A., Plant Pathosystems. Berlin: Springer-Verlag, 1976.
[11] Raz, R., Jose, M., Moya, A., Martinez-Izquierdo, J. A., Puigdomenech, P., Different mechanisms generating sequence variability are revealed in distinct regions of the hydroxyproline-rich glycoprotein gene from maize and related species. Mol. Gen. Genet., 1992, **233**: 252－259.
[12] Ellingboe, A. H., Changing concepts in plant-pathogen genetics, Annu. Rev. Phytopathol., 1981, **19**: 125－143.
[13] 董汉松，非亲和性识别与逆反理论，山东科学，1993，**6**(2)：102－104。
[14] Matsuda, I., Shiyomi, M., Process of risk assessment for transgenic plant in Japan. See Ref., 7, 72.
[15] 董汉松，根瘤菌、根癌土壤杆菌与寄主植物接触识别的机制，山东农业大学学报，1994，**25**：367－373。
[16] Kondorosi, A., Regulation of nodulation genes in rhizobia. In Molecular Signals in Plant-Microbe Communications (Verma, D. P. S., ed.). Boca Raton et al.: CRC Press, 1991, 325－340.

QUESTIONARY CONSIDERATIONS AND PERSPECTIVES ON PLANT-PATHOGEN INTERACTION AND PLANT DISEASE CONTROL

Dong Hansong and Xu Wenlian

Different types of plant resistance to diseases are thought to be characteristics awarded by plant-pathogen interactions, and effects of disease management be dependent on whether strategies and methods of the management are designed based on the interaction principles. These correlations are taken as the standpoints of the questionary considerations and perspectives in this paper.

For the research contents, three categories are involved in the interactions (Dong, the Introduction of this book). The first one is plant-pathogen coevolution, and a lot of experimental proofs are required to fulfill the following sketch:



This is only one of insights from the plant as a partner of the interaction. Otherwise, more attentions will be paid to the possibility that the recoevolution between plants and pathogens could be caused by the practical use of transgenic plants and release of genetically engineered microbes. As regard of the second category, the perfor-

mation gene for gene interaction, it is a critical proof to obtain the plant R genes and characterize their products in interacting with the pathogen *avr* genes or their products. Also, whether the suppressors of R or *ds* genes exist and how they act remain to be known. Lastly, for any interaction system studied, a lot of experimental proofs are also required to demonstrate the responsive chain and network in the disease defence (Dong, the Introduction).

Practical excutions of plant disease control seem to be in a dilemma. Almost all of the actual methods used follow a common principle, i. e. enhancing or fortifying plants and weakening or even killing pathogens, which may result in increasing hostilities of plant-pathogen interactions and series of problems. The chemical control method is content with nothing less than destruction of pathogens, increasingly accompanied with the pesticide resistance with which the pathogens manage to exist. Biocontrol is an approach to weaken the vitality and ability of competition among microbe flora of pathogens and even kill them, and also a stress to lead to the emergence of certain mechanisms of pathogens to overcome the antagonistic element. Disease resistance breeding awards a crop one or more new genes which will be sequentially matched, or discovered by one or more new genes of a pathogen, and this opportunity could go to any length due to the genetic engineering which makes it possible to transfer any resistance gene from any source of organisms. Being considered together with the genetically engineered microbes, however risks of the re-coevolution are forecast would hardly be they will be. Evidently, a strategic alternation is needed for disease control.

Such a changed strategy is to construct a situation of peaceful coexistence of plant-pathogen interactions, by transferring the hostility to compromise tendency of diseaes managements. Symbiotic interactions of rhizobia with their hosts are the good indication. A brief and convenient idea is to introduce special genes into plants, which allow pathogen to obtain their exsitence, and at the same time introduce special genes into pathogens, which can benefit plant development. On the other hand, if being taken as a strategy for plant disease management, such an idea of peacefull coexistence should be investigated at a systematic procedure of researches. The critical steps would include: ① selecting a pathosystem conveniently suitable for the purpose; ② shedding light on genetic backgrounds of the plant-pathogen interaction; ③ finding out a key step or gene in the interaction to be taken as operating target, and ④ sufficiently estimating the risks possibly resulted from the construction by genetic engineering methods. This procedure would benefit from the information about historical events in the plant-pathogen coevolution.